



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS**

GABRIEL CAMARGO DA SILVA

**Alterações cardiometabólicas em ratos submetidos ao
desmame precoce farmacológico induzido por
Bromocriptina**

GOIÂNIA

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese

2. Nome completo do autor

Gabriel Camargo da Silva

3. Título do trabalho

ALTERAÇÕES CARDIOMETABÓLICAS EM RATOS SUBMETIDOS AO DESMAME PRECOCE FARMACOLÓGICO INDUZIDO POR BROMOCRIPTINA

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Mello Gomes, Professor do Magistério Superior**, em 30/11/2021, às 15:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **GABRIEL CAMARGO DA SILVA, Discente**, em 01/12/2021, às 15:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2461818** e o código CRC **101F9518**.

Referência: Processo nº 23070.053982/2021-47

SEI nº 2461818

GABRIEL CAMARGO DA SILVA

**Alterações cardiometabólicas em ratos submetidos ao
desmame precoce farmacológico induzido por
Bromocriptina**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás (UFG), como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Área de concentração: Ciências Fisiológicas

Orientador: Professor Doutor Rodrigo Mello Gomes

GOIÂNIA

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Silva, Gabriel Camargo da
Alterações cardiometabólicas em ratos submetidos ao desmame precoce farmacológico induzido por Bromocriptina [manuscrito] / Gabriel Camargo da Silva. - 2021.
LXXII, 72 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Mello Gomes.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Goiânia, 2021.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Lactação. 2. desmame precoce. 3. programação metabólica. 4. alterações cardiovasculares. I. Gomes, Rodrigo Mello, orient. II. Título.

CDU 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº 05 da sessão de Defesa de Tese do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas que confere o título de Doutor a **Gabriel Camargo da Silva** em Ciências Fisiológicas, na área de concentração em Ciências Fisiológicas.

Aos vinte e cinco dias do mês de outubro de 2021, a partir das 09:00 horas, por videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada “ALTERAÇÕES CARDIOMETABÓLICAS EM RATOS SUBMETIDOS AO DESMAME PRECOCE FARMACOLÓGICO INDUZIDO POR BROMOCRIPTINA”. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor Rodrigo Mello Gomes (ICB - UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor Doutor Antonio Marcus de Andrade Paes (UFMA), membro titular externo; Professor Doutor Júlio Cezar de Oliveira (UFMT), membro titular externo; Professora Doutora Kesia Gemima Palma Rigo Wutzow (UEM), membro titular externo; Professora Doutora Aline Priscila Pansani (ICB - UFG), membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do **trabalho**. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor Rodrigo Mello Gomes, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos vinte e cinco dias do mês de outubro de 2021.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Aline Priscila Pansani, Professora do Magistério Superior**, em 25/10/2021, às 13:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Mello Gomes, Professor do Magistério Superior**, em 25/10/2021, às 13:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Júlio Cezar de Oliveira, Usuário Externo**, em 25/10/2021, às 19:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Alves Rosa, Coordenador de Pós-graduação**, em 03/11/2021, às 12:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2401239** e o código CRC **66D931E1**.

Referência: Processo nº 23070.053982/2021-47

SEI nº 2401239

GABRIEL CAMARGO DA SILVA

**ALTERAÇÕES CARDIOMETABÓLICAS EM RATOS SUBMETIDOS
AO DESMAME PRECOCE FARMACOLÓGICO INDUZIDO POR
BROMOCRIPTINA**

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Aline Priscila Pansani
Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Antônio Marcus de Andrade Paes
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Júlio Cezar de Oliveira
Universidade Federal do Mato Grosso

Prof.^a Dra. Kesia Gemima Palma Rigo Wutzow
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: ____/____/____

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Goiás e ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas pela formação profissional. À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pelo apoio financeiro durante a execução deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Mello Gomes, pela oportunidade, paciência e todo ensinamento durante minha trajetória acadêmica.

Ao Laboratório Integrado de Fisiologia Cardiovascular e Neurológica, em especial ao Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro e as doutorandas Amanda Bessa e Jaqueline Moura.

Aos colaboradores Yohanny Souza, Lucas Ferreira, Larissa Turones e Larissa Coutinho que foram extremamente importantes no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores do Instituto de Ciências Biológicas II, que contribuíram brilhantemente para a minha formação, em especial ao Prof. Dr. Carlos Henrique Xavier Custódio e Prof. Dr. Reginaldo Nassar Ferreira.

Por fim, agradeço a todos que torceram por mim, e de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas Siglas.....	i
Lista de Figuras.....	iii
Lista de Tabelas.....	iv
Lista de Sigla de Aminoácidos.....	v
Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
1 Introdução.....	8
1.1 Lactação.....	8
1.2 Desmame Precoce.....	9
1.3 Obesidade.....	10
1.4 Hipertensão.....	15
1.5 Sistema Renina-Angiotensina.....	16
2 Objetivos.....	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3 Materiais e Métodos.....	19
3.1 Animais.....	19
3.2 Desmame Precoce Pela Administração de Bromocriptina e Avaliação da Ingestão de Ração e Peso Corporal.....	19
3.3 Implantação de Cânula na Artéria Femoral.....	20
3.4 Registro de Pressão Arterial e Frequência Cardíaca.....	20
3.5 Coração Isolado.....	21
3.6Reatividade Vascular Aórtica.....	23
3.7 Eutanásia e Coleta de Tecidos.....	25
3.8 Análises Histológicas.....	25
3.9 Western Blot.....	26
3.10 Análise Estatística.....	27
4 Resultados.....	28
4.1 Influência do Desmame Precoce Sobre a Massa Corpórea e ingestão Alimentar.....	28

4.2 Efeitos do Desmame Precoce Sobre a Adiposidade e Parâmetros Biométricos.....	29
4.3 Alterações Pressóricas e Taquicárdicas Induzidas Pelo Desmame Precoce.....	32
4.4 Influência do Desmame Precoce na Função Ventricular Esquerda em Corações Isolados.....	33
4.5 Efeitos do Desmame Precoce Sobre a Massa e Morfologia Cardíaca.....	35
4.6 Influência do Desmame Precoce na Reatividade Vascular Aórtica.....	38
4.7 Influência do Desmame Precoce Sobre a Expressão Proteica dos Receptores do SRA.....	39
4.8 Influência do Desmame Precoce Sobre a Expressão Proteica dos Receptores Akt e pAkt.....	40
4.9 Influência do Desmame Precoce Sobre a Expressão Proteica da Enzima Superóxido Dismutase.....	41
4.10 Influência do Desmame Precoce Sobre a Expressão de GHS-R1a.....	42
5 Discussão.....	44
6 Conclusão.....	52
7 Referências.....	53
8 Anexo.....	64

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ACh – Acetilcolina
AE – Átrio Esquerdo
AGRP - Proteína Relacionada à Agouti
Akt – Proteína Quinase B
Ang I – Angiotensina I
Ang II – Angiotensina II
Ang-(1-7) – Angiotensina-(1-7)
Ang-(1-9) – Angiotensina-(1-9)
ARC - Núcleo Arqueado Hipotalâmico
AT1 – Receptor de Angiotensina II do tipo 1
AT2 – Receptor de Angiotensina II do tipo 2
bpm – Batimentos por Minuto
CO₂ – Dióxido de Carbono
CT – Controle
DP – Desmame Precoce
ECA – Enzima Conversora de Angiotensina
ECA 2 – Enzima Conversora de Angiotensina II
EO – Estresse Oxidativo
EPM – Erro Padrão da Média
ERK 1/2 – Quinase reguladora de sinal extracelular 1 e 2
EROS – Espécies Reativas de Oxigênio
FC – Frequência Cardíaca
GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GH – Hormônio do Crescimento
GHS-R1a - Receptor Secretagogo do Hormônio de Crescimento subtipo 1a
GOAT - Grelina O-aciltransferase
i.p. – Intra-peritoneal
LH – Hipotálamo Lateral
MAS – Receptor de Angiotensina-(1-7)
mg – Miligrama
mmHg – Milímetros de Mercúrio

μg - Micrograma
NO – Óxido Nítrico
NPS – Nitroprussiato de Sódio
NPY – Neuropeptídeo Y
 O_2 - Oxigênio
 O_2^- - ânion Superóxido
ObRs – Receptores de Leptina
OMS – Organização Mundial da Saúde
PA – Pressão Arterial
PAD – Pressão Arterial Diastólica
PAM – Pressão Arterial Média
PAS – Pressão Arterial Sistólica
PE – Polietileno
PHE – Fenilefrina
PIVD – Pressão Intraventricular Diastólica
PIVS - Pressão Intraventricular Sistólica
PVN – NúcleoParaventricularHipotâmico
SKH - Solução de Krebs-Henseleit
SKR - Solução de Krebs-Ringer
SNS – Sistema Nervo Simpático
SOD – Superóxido Dismutase
SRA – Sistema Renina-Angiotensina
T3 – Triiodotironina
THR – Hormônio Liberador de Tireotrofina
TSH – Hormônio Tireoestimulante
VE – Ventrículo Esquerdo
VIGITEL - Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da grelina em humano e rato.

Figura 2: Efeitos fisiológicos da grelina.

Figura 3: Esquema simplificado do Sistema Renina-Angiotensina.

Figura 4: Representação esquemática da técnica de Langedorff com fluxo constante

Figura 5: Representação esquemática da preparação de anel aórtico de rato no banho de órgãos

Figura 6: Massa corporal e consumo alimentar de ratos submetidos ao desmame precoce.

Figura 7: Efeitos do desmame precoce no peso dos depósitos de gordura.

Figura 8: Efeito do desmame precoce sobre a massa dos órgãos.

Figura 9: Alterações dos parâmetros pressóricos e taquicárdicos induzidos pelo desmame precoce.

Figura 10: Variação, em percentual, dos valores obtidos durante o protocolo de isquemia-reperusão.

Figura 11: Efeito do desmame precoce sobre a massa cardíaca.

Figura 12: Diâmetro dos cardiomiócitos em animais submetidos ao desmame precoce.

Figura 13: Efeito do desmame precoce sobre a fibrose intersticial.

Figura 14: Efeito do desmame precoce sobre a fibrose perivascular.

Figura 15: Efeito do desmame precoce na reatividade vascular aórtica.

Figura 16: Expressão de proteínas dos receptores AT1, AT2 e MAS em corações de ratos submetidos ao desmame precoce.

Figura 17: Expressão de proteínas dos receptores Akt e pAkt em corações de ratos submetidos ao desmame precoce.

Figura 18: Expressão da enzima Superóxido Desmutase em corações de ratos submetidos ao desmame precoce.

Figura 19: Expressão de proteínas subtipo 1a do receptor de grelina (GHS-R1a) em ratos submetidos ao desmame precoce.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sinais centrais e periféricos relacionados ao controle da homeostase energética.

Tabela 2: Composição da Solução de Krebs-Ringer.

Tabela 3: Composição da Solução Krebs-Henseleit.

Tabela 4: Lista de anticorpos utilizados para técnica de Western Blot.

Tabela 5: Parâmetros basais da função ventricular esquerda em corações isolados de ratos submetidos ao desmame precoce.

LISTA DE SIGLAS DE AMINOÁCIDOS

Glicina	G	Gly
Alanina	A	Ala
Valina	V	Val
Leucina	L	Leu
Isoleucina	I	Ile
Fenilalanina	F	Phe
Tirosina	Y	Tyr
Triptofano	W	Trp
Serina	S	Ser
Treonina	T	Thr
Cisteína	C	Cys
Metionina	M	Met
Ácido Aspártico	D	Asp
Ácido Glutâmico	E	Glu
Histidina	H	His
Lisina	K	Lis
Arginina	R	Arg
Asparginina	N	Asn
Glutamina	Q	Gln
Prolina	P	Pro

RESUMO

A amamentação exclusiva durante os 6 primeiros meses de vida é de fundamental importância para a saúde da criança. Perturbações nutricionais e ambientais durante o período de lactação promovem alterações epigenéticas que culminam em disfunções metabólicas na prole ao longo da vida. Nesse sentido, a interrupção da lactação antes do período estabelecido pode causar, dentre outras alterações, obesidade e hipertensão durante a vida adulta. Este trabalho teve como principal objetivo, avaliar as alterações cardiometabólicas em ratos Wistar submetidos ao desmame precoce farmacológico induzido pela bromocriptina. Após o nascimento, foi realizada a sexagem para formação de ninhadas contendo 6 filhotes machos por mãe e dois grupos foram formados: desmame precoce (DP) e controle (CT). Nos 3 últimos dias de lactação, as mães pertencentes ao grupo DP receberam injeções diárias (0,5 mg - duas vezes por dia) de bromocriptina. Durante o período de lactação, o peso corporal dos filhotes foi monitorado nos dias 1, 7, 14, 18, 19, 20 e 21. Logo após, os filhotes foram separados e mantidos em caixas contendo 3 animais cada. Durante 180 dias, a ingestão alimentar e o peso corporal foram monitorados semanalmente. Após este período, foi realizado registro acordado para avaliação dos parâmetros cardiovasculares. Posteriormente, a função contrátil do ventrículo esquerdo e reatividade coronariana foram avaliadas durante o protocolo de isquemia/reperfusão pela técnica de Langendorff e a reatividade vascular aórtica por meio do vaso isolado em banho de órgãos. Por fim, os animais foram eutanasiados e os órgãos coletados para análise histológica e Western blot. Os animais do grupo DP desenvolveram o fenótipo de obesidade, observado a partir do aumento de depósitos de gorduras. Não foi observado aumento da ingestão de ração dos animais deste mesmo grupo. Foram observadas, durante o registro dos parâmetros cardiovasculares nos animais acordados, aumento da PAM, PS, PD e FC nos animais submetidos ao DP. O fluxo coronariano basal foi reduzido nos animais do grupo DP e, após a reperfusão, foi aumentado. Além disso, verificamos a presença de remodelamento cardíaco nos animais do grupo DP, a partir da presença de fibrose intersticial e hipertrofia dos cardiomiócitos, assim como alterações na expressão proteica dos receptores AT1 e MAS, redução na expressão proteica da enzima antioxidante SOD e redução na expressão da proteína Akt. O presente estudo demonstrou que o DP farmacológico induzido por bromocriptina causou obesidade e aumento da pressão arterial e frequência cardíaca. Sendo assim, pela primeira vez, foi demonstrado que o DP farmacológico é capaz de promover alterações cardiovasculares, sugerindo que este modelo desencadeia programação metabólica, afetando de maneira negativa, estes animais durante a vida adulta.

Palavras-chave: Lactação, desmame precoce, programação metabólica, alterações cardiovasculares.

ABSTRACT

Exclusive breastfeeding during the first six months of life is fundamental important for the child's health. Nutritional and environmental disorders during the lactation period promote epigenetic changes that culminate in metabolic dysfunctions in the offspring throughout the life. Thereby, interrupting lactation before the established period can cause, among other changes, obesity and hypertension during adulthood. This work aimed to evaluate the cardiometabolic disruptions in Wistar rats that were submitted to pharmacological early weaning, induced by bromocriptine. After birth, sexing was carried out to form litters containing six males per mother and two groups were formed: early weaning (DP) and control (CT). In the last 3 days of lactation, mothers belonging to the DP group received daily injections (0.5 mg - twice daily) of bromocriptine. During the lactation period, the pups' body weight was monitored on days 1, 7, 14, 18, 19, 20 and 21. After, the offspring were separated and kept in boxes containing three animals each. For 180 days, food intake and body weight were monitored weekly. After this period, was performed measurements of cardiovascular parameters. Subsequently, contractile function of the left ventricle and coronary reactivity were assessed during the ischemia/reperfusion protocol using the Langendorff technique and aortic vascular reactivity through the isolated vessel in an organ bath. Finally, the animals were euthanized and the organs were collected for histological analysis and Western blot. The animals in the DP group developed obesity phenotype increase in adipose tissue. Interestingly, there was no increase in food intake. During the recording of cardiovascular parameters in the awake animals, an increase in MAP, SP, DP and HR was observed in animals submitted to DP. Baseline coronary flow was reduced in animals in the DP group and, after reperfusion, it was significantly increased. In addition, it was verified the presence of cardiac remodeling in the animals of the DP group, from the presence of interstitial fibrosis and cardiomyocytes hypertrophy. Finally, we showed low protein expression of the AT1 and MAS receptors, antioxidant enzyme SOD and Akt protein expression. The present study demonstrated that pharmacological DP induced by maternal bromocriptine injections, caused obese phenotype and increase in blood pressure and heart rate. Thus, for the first time, it was demonstrated that pharmacological DP promoting cardiovascular changes, suggesting that this model triggers cardiometabolic programming, negatively affecting these animals during adulthood.

Keywords: Lactations, early weaning, metabolic programming, cardiovascular changes.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Lactação

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a amamentação exclusiva é de extrema importância para a saúde da criança e deve ocorrer durante os seis primeiros meses de vida [1]. Além de benefícios para a mãe, como menor prevalência de diabetes tipo 2, hiperlipidemia, doenças relacionadas ao sistema cardiovascular e hipertensão arterial durante o primeiro ano de vida do lactente, foi observado, em curto prazo, uma redução da mortalidade e da morbidade por doenças infecciosas em crianças [2-3]. Por conter macronutrientes, micronutrientes e hormônios, o leite materno se torna a principal fonte de nutrientes para o adequado desenvolvimento de bebês e crianças [4]. Adicionalmente, o contato físico entre a mãe e o bebê garante que o filho se adapte ao novo ambiente devido a proteção social e maturação de vias neurais, que irá acontecer principalmente por mecanismos de aprendizado [5-6]. Em mamíferos, a capacidade de desenvolvimento das vias neurocomportamentais é inata, porém, tal desenvolvimento está ligado às respostas a estímulos ambientais específicos [7]. Além disso, no início da vida, existe o “período crítico, onde ocorrem intensas mudanças estruturais e funcionais [8]. Na fase pré-natal, ocorre a organização e multiplicação dos neuroblastos, definido como o primeiro período crítico [9]. Já no segundo período, durante a lactação, ocorre um rápido crescimento encefálico, sinaptogênese e multiplicação das células da glia [10].

Estudos evidenciaram que a obesidade infantil está intimamente relacionada com a redução do tempo ideal de amamentação [11]. Portanto, o leite materno reduz os riscos de distúrbios metabólicos, como obesidade e sobrepeso [12]. Além disso, foi demonstrado que o leite materno reduz em até 22% o risco de obesidade durante a vida adulta [13]. Vários estudos demonstraram que alterações de fatores epigenéticos em períodos críticos do desenvolvimento, como a gestação e lactação, podem resultar em fenótipo obeso e alterações cardiometabólicas durante a vida adulta (mecanismo conhecido como programação) [14-16]. O tipo de nutrição, presença de

agentes estressores e estado hormonal, durante a lactação, pode culminar na programação metabólica. Estudos demonstraram que a desnutrição calórica e/ou proteica promove alteração significativa no ganho de peso corporal sem modificar a ingestão alimentar, em ratos adultos [17-20]. Além do aumento do peso corporal, a desnutrição calórica e proteica durante a lactação promove o aumento da expressão do hormônio de crescimento (GH), redução do hormônio tireoestimulante (TSH) e aumento da expressão de receptores de leptina na hipófise [19-20]. Adicionalmente, foi demonstrado que o hipertireoidismo neonatal está relacionado com o hipertireoidismo na vida adulta, elucidando que alterações nos hormônios da tireóide, no período de lactação, podem afetar de maneira permanente o eixo Hipotálamo-Hipófise-Tireóide. Apesar de todos os dados mencionados sobre os benefícios da amamentação para o desenvolvimento da criança, no mundo, a prevalência de aleitamento materno exclusivo é de apenas 35% em crianças menores de 4 meses [1].

1.2 Desmame Precoce

O desmame é um processo gradual e natural caracterizado pela introdução da alimentação complementar e redução da alimentação por leite materno, que deverá prosseguir por até dois anos de idade [21]. Por sua vez, a interrupção do aleitamento materno, antes do período estabelecido pela OMS para o bom desenvolvimento da criança, é chamada desmame precoce (DP) [22-23]. Em ratos criados em laboratório, o desmame ocorre após o 21º dia de vida, sendo que até o 14º dia a alimentação é exclusivamente pelo leite materno, uma vez que os filhotes ainda não possuem capacidade fisiológica para o consumo de alimentos sólidos[21, 24]. Após o desmame, os nutrientes da dieta são modificados com a substituição dos lipídeos presentes no leite materno por, principalmente, carboidratos presentes na ração [25]. Além disso, foi demonstrado que o desmame precoce, em ratos, culmina em uma série de alterações comportamentais e fisiológicas[26].

Um dos modelos utilizados de desmame precoce, em ratos, é o de interrupção da lactação, nos últimos três dias, por enfaixe materno. Neste modelo, os filhotes apresentaram uma redução significativa do peso corporal e

redução da gordura total, além de hipoglicemia e hipoinsulinemia aos 21 dias de vida. Interessantemente, após 180 dias do nascimento, esses animais apresentam, dentre outras alterações, sobrepeso, maior adiposidade total e visceral, níveis aumentados de glicose, hiperteleptinemia e resistência à insulina [27].

Além do modelo acima descrito, o desmame precoce pode ser induzido a partir da inibição farmacológica da prolactina pela Bromocriptina nos 3 últimos dias da lactação[28]. A Bromocriptina é um derivado semissintético da proteína Ergocriptina, encontrada em fungos do gênero *Claviseps*, comum em plantações de cereais[29]. É um agonista do receptor D2 de dopamina e é utilizado há anos no tratamento de doenças como Parkinson, prolactinomas, acromegalia, entre outras. Animais, cujo as mães foram tratadas com Bromocriptina durante a lactação, apresentaram, na vida adulta, alterações como: maior massa corporal, hiperleptinemia, resistência central à leptina, hipotireoidismo, além de inflamação hipotalâmica, que está relacionada ao sobrepeso e excesso de leptina no modelo descrito[28]. Como visto em ambos os modelos citados, além das alterações metabólicas descritas, o desmame precoce promove a hiperleptinemia, que juntamente com outros fatores oriundos da programação metabólica, está intimamente relacionada a obesidade.

1.3 Obesidade

A obesidade é designada como uma doença crônica não transmissível e tem como característica o excesso de gordura corporal resultante do desequilíbrio entre o gasto energético e a ingestão alimentar [30].

De acordo com a OMS, os casos de obesidade vêm crescendo de maneira assustadora em todo o mundo e estima-se que 12% da população mundial é obesa [31]. Além disso, a obesidade é a causa da morte de 2,8 milhões de pessoas por ano[31]. No Brasil, segundo uma pesquisa da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel), com indivíduos maiores de 18 anos de idade, mais da metade da população está acima do peso. Esses dados estatísticos estão intimamente relacionados com a mudança de hábitos alimentares e

comportamentais. Nos últimos tempos, houve um aumento global na ingestão de alimentos excessivamente calóricos e ricos em gordura, sal e açúcares[32]. Além disso, devido, principalmente, a mudança dos meios de transporte e um acentuado aumento da urbanização, houve uma queda da prática de atividade física. Devido a estes fatos, Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia, em média, 80% da população brasileira é considerada sedentária [33]. Apesar do grande número de casos, a etiologia da obesidade, segundo Wanderley e Ferreira (2010), é bastante complexa e envolve amplos fatores como culturais e biológicos [34].

Fisiologicamente, o controle da homeostase energética é regido principalmente por circuitos neurais que regulam o comportamento e o balanço energético baseado em sinais metabólicos e endócrinos para motivar, ou não, a busca por alimentos [35]. Segundo Velkoskae Morris (2011) existem diversos mecanismos, centrais e periféricos, com uma diversidade de sinais e vias, envolvidas na homeostase energética (Tabela 1) e alterações em tais vias durante o período neonatal estão intimamente relacionadas com a obesidade na vida adulta [36].

Tabela 1: Sinais centrais (C) e periféricos (P) relacionados ao controle da homeostase energética (adaptado de Velkoska e Morris [(2011)]).

Orexigênico	Anorexigênico
Adipsina (P)	Leptina (P)
Glicocorticóides (P)	Adiponectina (P)
Angiotensina II(P)	Resistina (P)
Grelina (P)	Fator de necrose tumoral α (P)
Neuropeptídeo Y	Colecistocinina (P)
Peptídeo relacionado ao agouti (C)	Peptídeo YY (P)
Orexina A e B (C)	Obestatina (P)
Galanina (C)	Insulina (P)
Noradrenalina (C)	Amilina (P)
Canabinóide (C)	Polipetídeo pancreático (P)
	Hormônio liberador de corticotrofina (C)
	Urocortina (C)
	Serotonina (C)
	Dopamina (C)

Sabe-se que o desenvolvimento dos circuitos neurais envolvidos na regulação do apetite, em ratos, ocorre no final da gestação e durante o período pós-natal, sugerindo assim que o desenvolvimento adequado desses circuitos estão suscetíveis à mudanças nutricionais e ambientais após o nascimento [36]. Dentre a diversidade de hormônios envolvidos no controle da homeostase energética, a leptina se destaca por exercer papel preponderante na programação durante a lactação[37]. Estudos em ratos evidenciaram que a administração de leptina nas mães lactantes promove o aumento de peso corporal dos filhos durante a vida adulta[38]. Além disso, como já mencionado anteriormente, animais obesos programados metabolicamente pelo desmame precoce, apresentam níveis aumentados de leptina [28]. Este peptídeo é composto por 167 resíduos de aminoácidos e é secretado principalmente pelo

tecido adiposo branco[39]. Em mamíferos, a leptina estimula a redução do apetite após a ativação dos seus receptores específicos (ObRs) expressos no hipotálamo e diversos tecidos periféricos[40-41]. Apesar de haver aumento significativo de leptina durante o período neonatal, que pode ser atribuído à transferência hormonal da mãe para o feto [42-43], esse hormônio não é capaz de modificar o padrão alimentar durante as três primeiras semanas de vida devido ao estágio de maturação das vias neurais envolvidas [44-45].

Além da leptina, o hormônio peptídico grelina (figura 1), um potente orexigênico, é um modulador fundamental do balanço energético, sendo responsável pelo aumento da busca por alimento, ingestão alimentar e deposição de gordura [46].

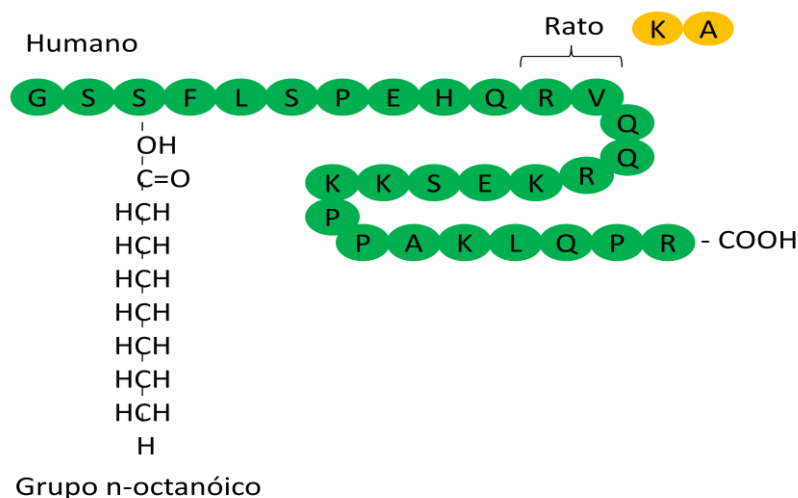


Figura 1: Estrutura da grelina em humano e rato. A grelina possui 28 aminoácidos em sua estrutura e a adição, mediada pela enzima Grelina O-aciltransferase (GOAT) de um grupo octanóico no terceiro aminoácido – Serina. A estrutura da grelina em ratos se difere da humana em relação ao 11º e 12º resíduo de aminoácido (Arginina e Valina / Lisina e Alanina). Adaptado de Kojima e Kangawa[47].

A grelina exerce suas diversas funções (figura 2) após a ativação do Receptor Secretagogo do Hormônio de Crescimento subtipo 1a (GHS-R1a) [48]. Estudos evidenciaram que há uma densa concentração de GHS-R1a no núcleo arqueado hipotalâmico (ARC), região extremamente importante na regulação do apetite [49]. Adicionalmente, o ARC possui projeções eferentes

para neurônios que, quando estimulados, liberam os peptídeos orexigênicos Neuropeptídeo Y (NPY) e Proteína Relacionada à Agouti (AGRP) [50].

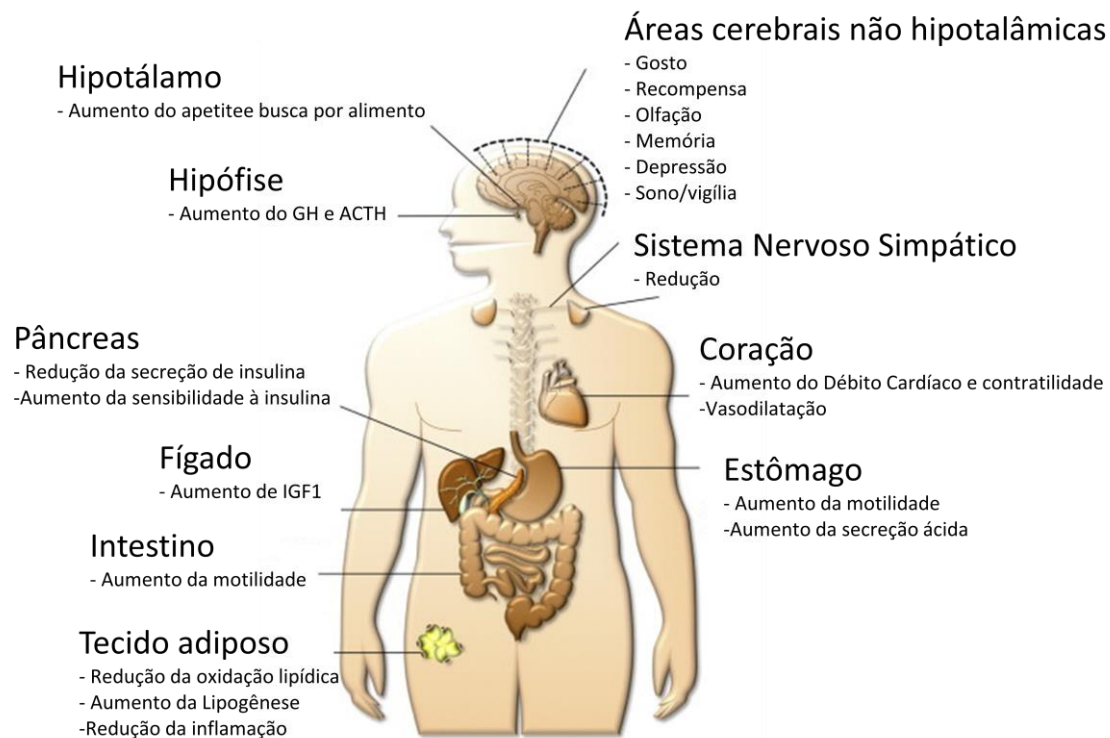


Figura 2: Efeitos fisiológicos da grelina. Adaptado de Muller e cols. (2015) [51].

Apesar da grelina ser um potente hormônio com efeito orexígeno e ser o alvo de diversos estudos, devido sua ação metabólica, os dados relacionando-a com o estado obeso necessitam ser elucidados. Interessantemente, estudos recentes têm demonstrado que os níveis deste peptídeo estão reduzidos em indivíduos obesos[52-53].

Além dos efeitos metabólicos citados, a grelina exerce uma importante função no sistema cardiovascular. Estudos demonstraram que a grelina é sintetizada e secretada por cardiomiócitos humanos e células endoteliais, sugerindo uma possível ação autócrina/parácrina no sistema cardiovascular [54-55]. Em humanos, a administração de grelina reduziu de maneira significativa a pressão arterial média, possivelmente devido ao seu efeito vasodilatador dependente de Óxido Nítrico (NO) [56-57]. Concentrações reduzidas de grelina podem ser, dentre outras diversas variáveis, um fator de risco importante na gênese da hipertensão [58]. Entretanto, apesar dos vários

efeitos cardioprotetores da grelina, a relação existente entre o peptídeo, hipertensão e obesidade necessita ser elucidada.

1.4 Hipertensão

Como descrito anteriormente, o desequilíbrio entre a ingestão alimentar e o gasto energético é um fator preponderante para o excesso de peso e desenvolvimento de obesidade, sendo essa última, uma causa potencial do desenvolvimento de doenças como *diabetes mellitus* tipo II, cânceres, doença coronariana, insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio, hipertensão, dentre outras[59]. Apesar dos mecanismos envolvidos na relação entre hipertensão e obesidade não serem totalmente conhecidos, sabe-se que há uma íntima relação entre ambas, possivelmente pela atividade exacerbada do sistema nervoso simpático, quantidade de gordura, retenção renal de sódio e o Sistema Renina-Angiotensina [60]. Em estudo realizado em humanos foi demonstrado que o bloqueio dos receptores alfa e beta-adrenérgicos foi capaz de inibir de maneira significativa a hipertensão relacionada à obesidade [61].

Adicionalmente, a hipertensão não foi verificada em camundongos obesos com deficiência de leptina, inferindo assim, que há uma estreita relação entre níveis aumentados de leptina e hipertensão no fenótipo obeso[62]. Uma condição amplamente visualizada na obesidade e, possivelmente, na hipertensão é a resistência à insulina. Foi demonstrado, em ratos, que a hiperinsulinemia exerce efeitos diretos na retenção de sódio e, conseqüentemente, na elevação da pressão arterial [63]. Além disso, a administração de insulina, em indivíduos hipertensos, promoveu o aumento dos níveis de noradrenalina, inferindo assim, sua modulação na atividade simpática[64]. Estudos observam que a insulina é capaz de promover o aumento da atividade simpática de maneira direta no sistema nervoso central [65].

O sistema cardiovascular possui diversos mecanismos regulatórios, dentre eles podemos citar a atividade do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático, atividade baroreflexa e quimio-reflexa, entre outros. Contudo, um dos mecanismos humorais mais proeminentes na regulação do sistema cardiovascular é o Sistema Renina-Angiotensina.

1.5 Sistema Renina-Angiotensina

Um dos principais mecanismos regulatórios do sistema cardiovascular é o Sistema Renina-Angiotensina (SRA) [(Fig. 3)]. O SRA se torna ativo após o (1) aumento da atividade simpática renal, (2) hipotensão arterial renal e/ou (3) redução das concentrações dos íons cloreto e sódio e aumento da concentração de potássio[66-68]. Após a ocorrência de um, ou todos os fatores citados, as células justaglomerulares dos rins promovem a liberação da pró-renina, que posteriormente será clivada em renina (enzima proteolítica responsável pela conversão de angiotensinogênio em angiotensina I (Ang I)[69]. Posteriormente, a Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), promove a conversão de Ang I em angiotensina II (Ang II), principal hormônio desse sistema[70]. Para exercer sua atividade, a Ang II se liga principalmente ao receptor AT1, expresso em diversos tecidos, e desencadeia uma vasta ação biológica no cérebro, rins, vasos sanguíneos, sistema imunológico e coração [71]. Entretanto, a Ang II se destaca por exercer um papel preponderante no controle da pressão arterial e equilíbrio de fluidos[72-73]. O desenvolvimento de patologias relacionadas ao receptor AT1 pode ocorrer devido a sua hiperativação, culminando, dentre outras alterações, em proliferação celular, fibrose e hipertrofia cardíaca[74-75]. Além do receptor AT1, a Ang II pode se ligar ao receptor AT2 e, apesar dos efeitos da sua ativação não serem totalmente compreendidos, postula-se que sua ativação evoca efeitos contrários aos observados após ativação de receptores AT1[76].

Outro peptídeo de importância significativa do SRA é a Angiotensina-(1-7) [(Ang 1-7)]. Este peptídeo pode ser formado a partir da Ang II, devido a ação catalítica da Enzima Conversa de Angiotensina II (ECA 2) ou pela clivagem da Ang I em Angiotensina-(1-9) [(Ang-1-9)], peptídeo que posteriormente pode ser convertido em Ang-(1-7) pela ECA[77-78]. A Ang-(1-7) tem seus efeitos evidenciados após a ativação do receptor MAS expresso em uma grande variedade de tecidos, incluindo as células endoteliais cardíacas. Devido suas ações opostas e contra regulatórias às observadas pela Ang II/AT1, a Ang-(1-7) possui uma ampla variedade de efeitos cardioprotetores, como vasodilatação, modulação da sensibilidade barorreflexa, melhora na reatividade coronariana,

efeito anti-hipertensivo, anti-hipertrófico e anti-fibrótico[79-82]. Por exercer as ações fisiológicas citadas, a via Ang-(1-7)/MAS se torna um importante alvo terapêutico das doenças cardiovasculares.

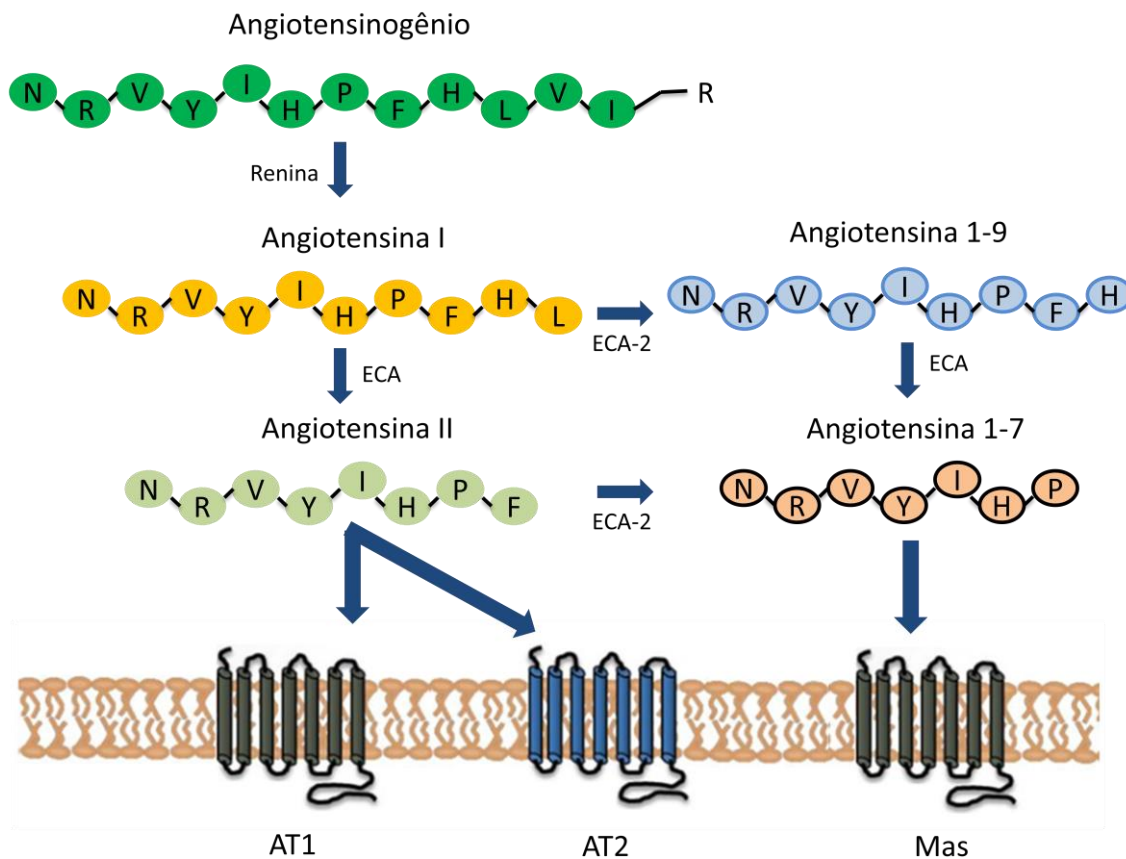


Figura 3: Esquema representativo simplificado do Sistema Renina-Angiotensina. ECA: Enzima Conversora de Angiotensina. ECA 2:Enzima Conversora de Angiotensina II. AT1: Receptor de Angiotensina II tipo 1. AT2: Receptor de Angiotensina II tipo 2. MAS: Receptor de Angiotensina-(1-7).

Diante de todas as informações descritas, podemos observar que há uma íntima relação entre o desmame precoce, obesidade e alterações cardiovasculares. Sendo assim, torna-se importante a ampliação de estudos relacionados aos mecanismos fisiopatológicos causados pela programação durante o período de lactação. Dentre os tipos de modelos experimentais de desmame precoce, verificamos no presente estudo a influência do desmame

precoce farmacológico induzido por bromocriptina sobre alterações cardiometabólicas em ratos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar as alterações cardiometabólicas induzidas pelo desmame precoce farmacológico em ratos Wistar machos.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos do desmame precoce farmacológico em relação aos seguintes parâmetros:

- Ingestão alimentar;
- Massa corporal;
- Pressão arterial e frequência cardíaca em ratos adultos;
- Função ventricular esquerda em corações isolados;
- Morfologia cardíaca (hipertrofia e fibrose intersticial e perivascular);
- Reatividade vascular de anéis de aorta;
- Expressão proteica dos receptores AT1, AT2, MAS e GHS-R1a, e das proteínas Akt, pAkt e SOD no tecido cardíaco.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Os experimentos foram realizados em ratos da linhagem Wistar provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás. Os animais foram alojados em caixas de prolipropileno (41 cm x 35cm x 16cm) com livre acesso à água e ração e com ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Os protocolos experimentais foram realizados de acordo com as normas de uso de animais e aprovados pelo comitê de ética da Universidade Federal de Goiás (CEUA - UFG) – Protocolo 001/2021. Após 15 dias de adaptação os animais foram acasalados em caixas contendo um macho e duas fêmeas. Depois de 7 dias, as fêmeas foram alojadas em caixas individuais e foram monitoradas diariamente para comprovação da prenhez. Após o nascimento dos filhotes, considerado o dia 1 do protocolo experimental, foi realizada a sexagem para formação de ninhadas com 6 filhotes machos por mãe. As ninhadas que não obtiveram 6 machos, foram complementadas com fêmeas. Por fim, as ninhadas foram divididas, aleatoriamente, em dois grupos, DP e CT.

3.2 Desmame Precoce pela Administração de Bromocriptina e Avaliação da Ingestão de Ração e Peso Corporal

Para indução do desmame precoce foi realizado injeções diárias de Bromocriptina (0,5 mg/ duas vezes ao dia, via i.p.) nas mães lactantes do grupo DP, nos dias 18, 19 e 20 do período de lactação, após o nascimento dos filhotes. As fêmeas lactantes do grupo CT receberam injeções de solução salina isotônica a fim de promover o mesmo estresse experimental das fêmeas do grupo DP. Todos os filhotes, de ambos os grupos, tiveram livre acesso as suas respectivas mães e ao cuidado materno durante os 21 dias do período de lactação.

O peso corporal dos animais, durante o período de amamentação, foi aferido nos dias 1, 7, 14, 18, 19, 20 e 21. No 21º dia de vida, os animais dos grupos experimentais foram definitivamente desmamados e mantidos em caixas contendo três animais cada. A ingestão alimentar em cada caixa foi monitorada semanalmente, do 21º ao 180º dia. As medidas de ingestão alimentar foram realizadas através da diferença entre o peso da ração oferecida e o peso da ração restante em cada caixa e dividida pelo número de animais da respectiva caixa.

3.3 Implantação de Cânula na Arterial Femoral

A confecção das cânulas foi realizada a partir de tubos de polietileno PE-10 (5 cm), soldados em outro tubo de polietileno PE-50 (17 cm) e obstruídas na extremidade livre do PE-50 com pino de metal. Para evitar a coagulação sanguínea, as cânulas foram preenchidas com heparina sódica, imediatamente antes de serem implantadas nos animais.

No dia 181 (D181), os animais foram submetidos à cirurgia para a introdução de cânula na artéria femoral. Os ratos foram anestesiados com Ketamina e Xilazina (100 mg e 20 mg/kg, Syntec, São Paulo, Brasil) e colocados em decúbito dorsal em uma prancha cirúrgica previamente aquecida. Foi realizada uma incisão na pele, separando a musculatura para localização da artéria femoral. A cânula foi introduzida na aorta abdominal através da artéria femoral, para registro dos parâmetros cardiovasculares. A cânula foi amarrada junto ao feixe com fio cirúrgico e dirigida subcutaneamente com auxílio de um trocater para a região escapular, onde foi exteriorizada e fixada com linha de sutura. Ao final do procedimento cirúrgico os animais receberam, por via subcutânea, doses de anti-inflamatório Flunixin (Chemitec®) (0,02 mL/kg) e antibiótico Pentabiótico (Fort Dodge®) (0,1 mL/kg). Após repouso de 24h, os experimentos foram iniciados. Apenas foram utilizados os animais que mantiveram um bom estado de saúde após os procedimentos cirúrgicos.

3.4 Registro de Pressão Arterial e Frequência Cardíaca

Após 24h do procedimento cirúrgico, no dia 182 (P182), a Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) dos animais foram monitoradas através da cânula implantada na artéria femoral esquerda e conectada a um transdutor de pressão acoplado um amplificador de sinal e um conversor analógico digital *PowerLab/400 (ADInstruments)*. Os valores de PAM, Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Diastólica (PAD) e FC foram amostrados a cada 2 minutos durante 45 minutos de registro.

3.5 Coração Isolado

No protocolo de órgão isolado, foram utilizados animais que não passaram pelo procedimento cirúrgico de canulação. Para avaliação da reatividade coronariana e contratilidade cardíaca *ex-vivo*, os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação, 10 minutos após terem sido heparinizados (200 U.I./mL de heparina) e foi utilizada a técnica de Langendorff (Fig. 4). A caixa torácica foi aberta, o coração retirado e colocado em um béquer com solução nutritora gelada de Krebs-Ringer (SKR) (Tabela 2) para diminuir o metabolismo miocárdico durante a canulação. O coração foi transferido para uma placa de Petri, também com solução nutritora gelada, e os tecidos pulmonar e vascular, esôfago e traqueia, anexos ao coração, foram removidos. A artéria aorta ascendente foi seccionada na altura de sua primeira ramificação e fixada a uma agulha de aço inoxidável conectada ao sistema de perfusão (Figura 3), com solução SKR gaseificada (95% O₂, 5% CO₂), com temperatura regulada a 37°C. Após ter sido conectado ao sistema de perfusão, um dreno de polietileno PE-50 foi introduzido pelo átrio esquerdo (AE) e conduzido até o ventrículo esquerdo (VE). Para análise da contratilidade cardíaca foi introduzido no VE, via AE, um balão conectado a um transdutor de pressão para registro da pressão intraventricular sistólica (PIVS), pressão intraventricular diastólica (PIVD), dP/dt máxima e mínima e FC.

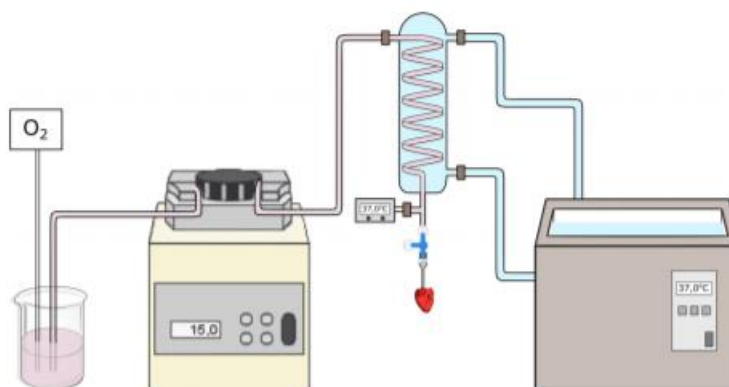


Figura 4: Representação da técnica de Langedorff[83].

Tabela 2: Composição da Solução de Krebs-Ringer

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO (mM)
NaCl	118,41
KCl	4,69
KH ₂ PO ₄	1,17
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,17
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,25
C ₆ H ₁₂ O ₆	11,65
NaHCO ₃	26,24

Após um período de estabilização de 20-30 minutos, os corações isolados foram submetidos ao protocolo de isquemia regional, por meio da oclusão da artéria coronária descendente anterior esquerda, durante 15 minutos. Após 15 minutos de isquemia, o fluxo para a artéria coronária foi liberado, e os corações foram perfundidos por mais 20 minutos.

3.6 Reatividade Vascular Aórtica

Para a avaliação da reatividade vascular aórtica, anéis de aorta torácica descendente, livre de tecido adiposo e conectivo, foram montados em cubas contendo Solução de Krebs-Henseleit (SKH) (Tabela 3) gaseificada (95% O₂ e 5% CO₂), com temperatura á 37°C, fixados á hastes metálicas acopladas á transdutores de força. Os animais foram eutanasiados por decapitação, 10 minutos após serem heparinizados (200 U.I./mL de heparina). A cavidadetorácica foi exposta e a aorta torácica descendente foi retirada e dividida em quatro anéis de 4 mm cada.Os anéis foram estabilizados por um período de 1 hora á uma tensão de 1,5 g. A presença deendotélio funcional foi avaliada pela porcentagem de relaxamento induzido pela acetilcolina(10 µm) nos vasos pré-contraídos com fenilefrina (0,1 µm). Para avaliação do relaxamento dependente de endotélio foram realizadas curvas dose-resposta cumulativas de acetilcolina (10⁻⁹ a 10⁻⁵ mol/L) em vasos com endotélio e para o relaxamento independente de endotélio, utilizou-se curva cumulativa de nitroprussiato de sódio (NPS 10⁻¹¹ a 10⁻⁶ mol/L).

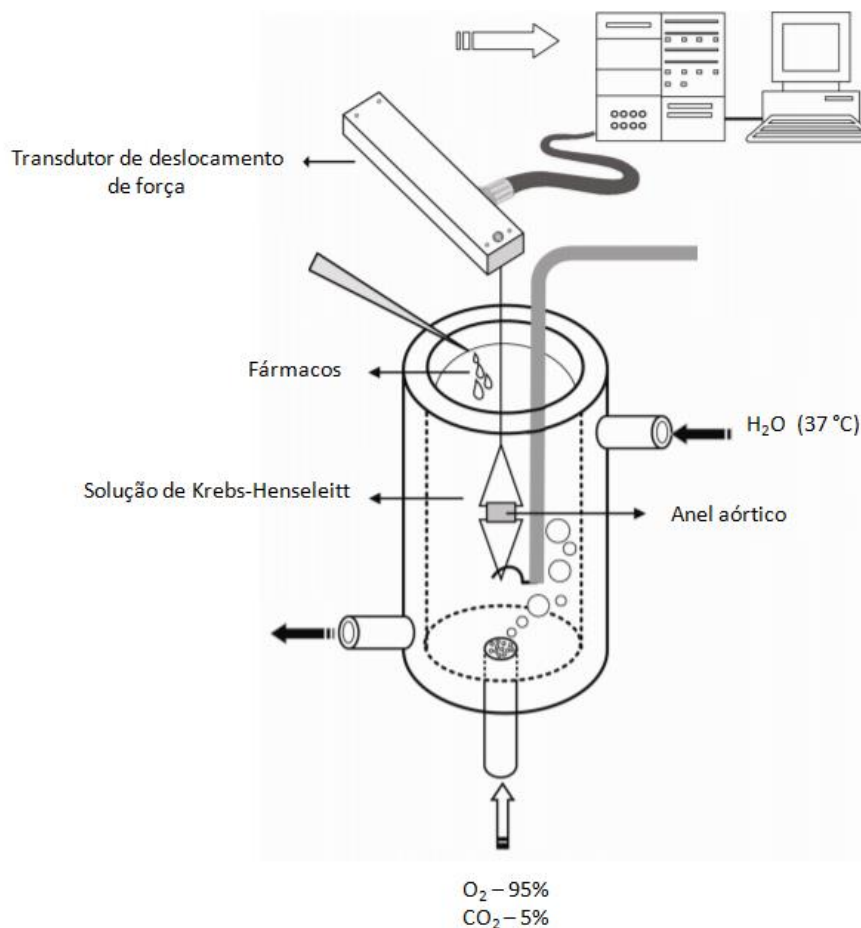


Figura 5: Representação esquemática da preparação de anel aórtico de rato no banho de órgãos. Adaptado de Yildiz e colaboradores (2013) [84].

Tabela 3: Composição da Solução de Krebs-Henseleit

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO (mmol/L)
NaCl	118,6
KCl	4,6
KH ₂ PO ₄	0,9
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,4
CaCl ₂ .2H ₂ O	3,3
C ₆ H ₁₂ O ₆	11,1
NaHCO ₃	24,9

3.7 Eutanásia e Coleta de Tecidos

Outros animais, diferentes dos submetidos aos protocolos de canulação e órgão isolado, foram utilizados para coleta de tecidos. Os animais foram submetidos ao jejum de 12 horas, anestesiados com tiopental sódico (40 mg/kg of BW, i.p., Thiopentax®, Cristália, Itapira, São Paulo, Brazil) e eutanasiados por exsanguinação para coleta de amostras de sangue, tecido adiposo, coração, glândulas adrenais, rins, pâncreas e fígado para posterior pesagem.

3.8 Análises Histológicas

Amostras do ventrículo esquerdo foram seccionadas em cortes não-seriais de 6 µm de espessura foram corados com hematoxilina e eosina para medição do diâmetro dos cardiomiócitos. As análises morfométricas foram feitas utilizando imagens digitalizadas (TIFF 24-bit color, 2560×1920 pixels), obtidas com um microscópio óptico (Olympus BX41, Tokyo, Japan), acoplado a uma câmera (DM500 plus ICC50 HD, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). O diâmetro de 20 cardiomiócitos foram medidos usando 20 imagens (magnificação 1000x) de cada animal (n=5). Cortes não-seriais de 6 µm de espessura de amostras de coração foram coradas com picosiriusred para mensuração de fibrose intersticial e perivascular. As análises morfométricas foram feitas utilizando imagens digitais (TIFF 24-bit color, 2560×1920 pixels) obtidas a partir de um microscópio óptico (Olympus BX41, Tokyo, Japan) acoplado a uma câmera (DM500 plus ICC50 HD, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). A fibrose intersticial e perivascular foi medida utilizando 20 imagens (magnificação 100x), de cada animal (n=5). O índice de fibrose perivascular foi determinado pela relação entre área de fibrose total e a área do lúmen. A porcentagem de fibrose intersticial foi estimada por estereologia, utilizando uma grade de 300 pontos de teste, e a fibrose intersticial foi estimada pela relação entre o número de pontos marcados por colágeno e o número total de pontos de teste. O diâmetro dos cardiomiócitos e o índice de fibrose perivascular foram mensurados utilizando o software ICY (Institut Pasteur, Paris, France). Fibrose intersticial foi feita utilizando o software Image Pro Plus v6 (Media Cybernetics, MD, USA).

3.9 Western Blot

Para análise da expressão proteica, amostras do ventrículo esquerdo foram homogeneizadas em tampão de lise (lysis buffer; PBS [137 mM NaCl, 2.4 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4], 8.8 mM IGEPAL CA-630, 12 mM Sodium Deoxycholate, 3.47 mM SDS, 2 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 2.34 μM Leupeptin, 0.154 μM Aprotinin, 1.45 μM Pepstatin) em um homogeneizador de vidro a 4° C durante 20 minutos para precipitação do material insolúvel e coletado sobrenadante. Após a centrifugação, o total de proteínas do sobrenadante foi quantificado através do método Bicinchoninic Acid (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) de acordo com as especificações do fabricante. As amostras foram desnaturadas em buffer Laemmli (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% Glycerol, 2% SDS, 1% 2-mercaptoethanol, 0.001% bromophenol blue). Alíquotas de 40 μg de proteína de cada amostra foram separadas através de SDS-PAGE. Após separação as proteínas foram transferidas do gel para membranas de nitrocelulose (Amersham Protran, GE Healthcare, Little Chalfont, BUX, UK). As membranas foram incubadas com uma solução de bloqueio (Leite desnatado Mólico 5%, Tris 10 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02%) sob agitação moderada por 90 min em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram incubadas com anticorpos primários específicos para as proteínas de interesse (Tabela 4). Posteriormente as membranas foram lavadas com TBST (3x 5 min; Tris 10 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02%) e incubadas com o anticorpo secundário, específico para cada anticorpo primário (Tabela 4), por 1:30 h e reveladas com solução para detecção por quimiluminescência (ECL; Amersham Biosciences, Londres, UK). A quimiluminescência foi detectada e as imagens capturadas pelo sistema de imagens ImageQuant LAS 4000 series (GE Healthcare, Chicago, IL, EUA). A intensidade das bandas foi quantificada por densidade óptica relativa utilizando o software ImageJ (NIH, MA, EUA). A GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) foi utilizado como controle de load.

Tabela 4: Lista de anticorpos utilizados para técnica de Western Blot.

Anticorpo	Fabricante e # do catálogo	Fonte	Diluição
Anti-AT1R	Santa Cruz, CA, USA (SC-515884)	Mouse monoclonal	1:1500
Anti-AT2R	Booster, CA, USA (M00432)	Rabbit monoclonal	1:500
Anti-MAS1	Santa Cruz, CA, USA (SC-390453)	Mouse monoclonal	1:500
Anti-Akt	Santa Cruz, CA, USA (SC-33437)	Rabbit monoclonal	1:200
Anti-pAkt	Santa Cruz, CA, USA (SC-33437)	Rabbit monoclonal	1:200
Anti-SOD	Santa Cruz, CA, USA (SC-11407)	Rabbit monoclonal	1:500
Anti-GHS-R1a	Santa Cruz, CA, USA (SC-11407)	Mouse monoclonal	1:500
Anti-GAPDH	Santa Cruz, CA, USA (SC-25778)	Rabbit monoclonal	1:500

3.10 Análise Estatística

Todos os dados do presente estudo foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). O peso corporal e a ingestão alimentar, assim como a avaliação da reatividade coronariana e reatividade aórtica foram analisados por *two-way*ANOVA seguido pelo pós-teste de Sidak. Para análise morfológica, western blot e dos parâmetros cardiovasculares *in vivo*, foi utilizado teste t não pareado. A construção dos gráficos e as análises estatísticas foram realizadas no software GraphPadPrism 6.0.

4. RESULTADOS

4.1 Influência do Desmame Precoce Sobre a Massa Corpórea e Ingestão Alimentar

A massa corporal dos animais foi mensurada durante e depois do período de lactação. Durante este protocolo, os filhotes foram pesados no dia do nascimento (D1) e nos dias 7 (D7), 14 (D14), 18 (D18), 19 (D19), 20 (D20) e 21 (D21). Durante o período de amamentação, em D19, D20 e D21, os filhotes pertencentes ao grupo DP apresentaram alterações significativas da massa corporal quando os grupos foram comparados (Figura 6A). Após a separação dos filhotes, os mesmos foram pesados semanalmente, do dia 28 (D28) ao dia 180 (D180). Durante este período, os animais submetidos ao DP apresentaram um aumento significativo da massa corporal a partir do dia 140 (D140), diferença que permaneceu até D180, quando comparados ao grupo controle (Figura 6B). Não houve diferença estatística em relação à ingestão alimentar (Figura 6C).

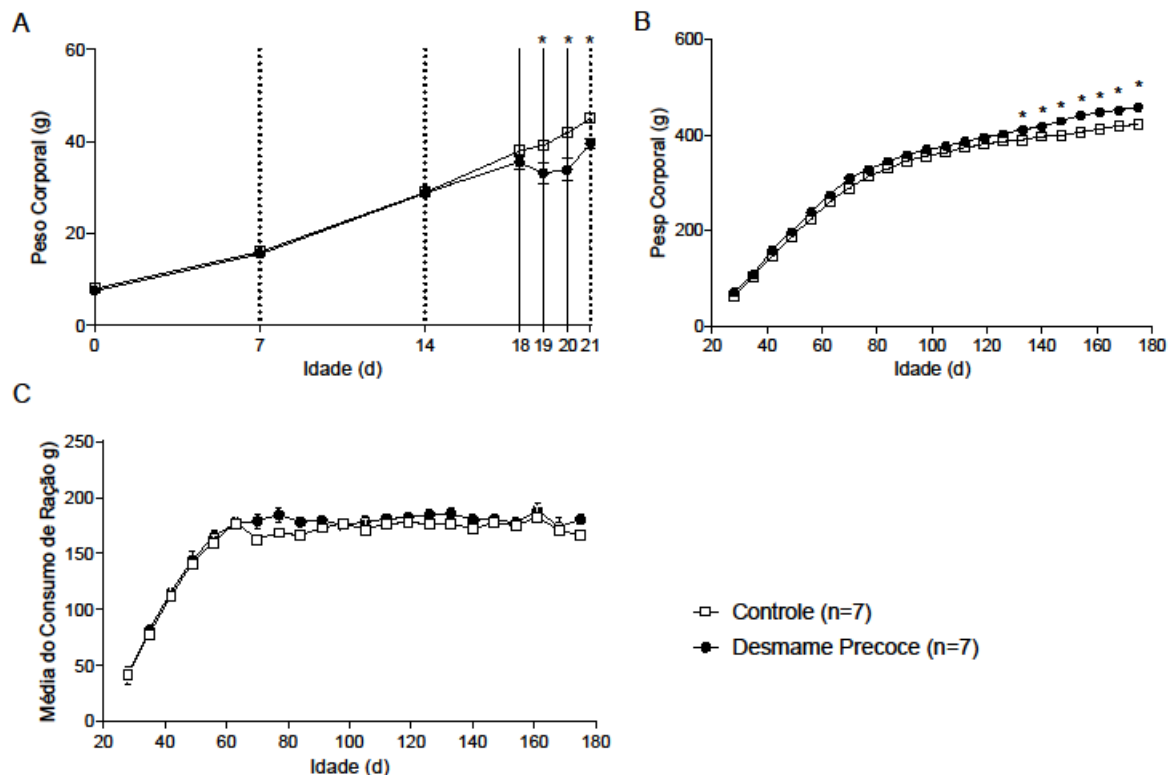


Figura6: Efeito do desmame precoce sobre a massa corporal e ingestão alimentar. **(A)** Avaliação da massa corporal dos animais após o nascimento até o 21º dia de vida. As administrações de Bromocriptina, no grupo DP, ocorreram nos dias D18, D19 e D20. **(B)** Massa corporal, mensurada semanalmente, dos animais após o período de desmame (D28 ao D180). **(C)** Média da ingestão alimentar semanal dos dias D28 ao D180. (n=7 ninhadas por grupo). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por *two-way* ANOVA, seguido pelo pós-teste de Sidak **(A – C)**. O nível de significância foi fixado em * $p < 0,05$.

4.2 Efeito do Desmame Precoce Sobre a Adiposidade e Parâmetros Biométricos

Corroborando os dados da literatura, a programação metabólica induzida pelo desmame precoce promoveu um aumento significativo da gordura retroperitoneal (CT $5,15 \pm 0,43$ vs. DP $8,2 \pm 0,73$ g; $p < 0,05$; Fig. 7A) e periepididimal (CT $3,65 \pm 0,17$ vs. DP $5,11 \pm 0,13$ g; $p < 0,05$; Fig. 7B) quando comparadas ao grupo controle.

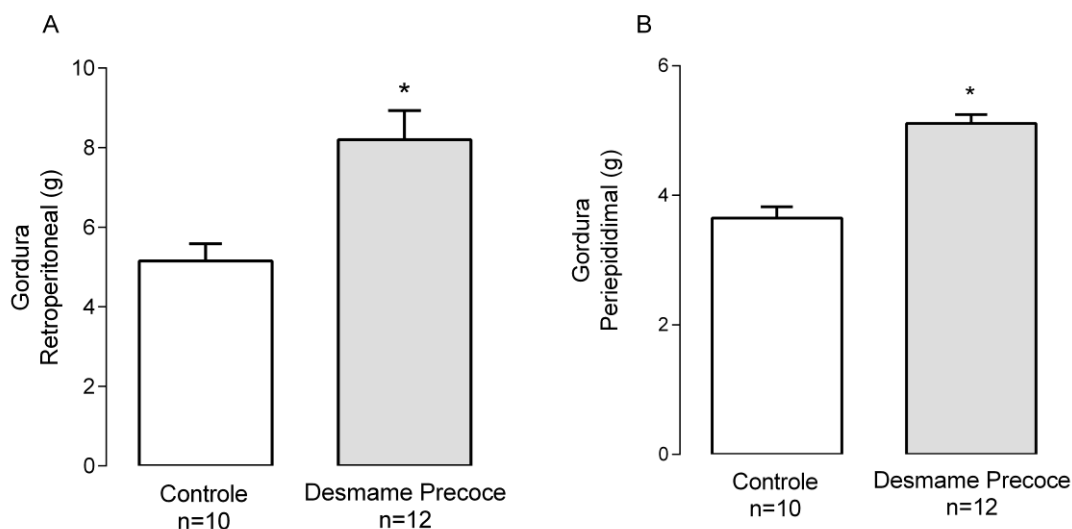


Figura7: Efeito do desmame precoce no peso dos depósitos de gordura. **(A)** Gordura Retroperitoneal, **(B)** Gordura Periepididimal. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por teste *t* de Student não pareado. O nível de significância foi fixado em * $p < 0,05$.

Além do aumento da deposição de gordura, os animais submetidos ao desmame precoce apresentaram, ao final do protocolo experimental, um aumento significativo da massa dos órgãos, em relação ao grupo CT. Pâncreas (CT $0,59 \pm 0,04$ vs. DP $0,96 \pm 0,05$ g; $p < 0,05$; Fig. 8A); Fígado (CT $12,47 \pm 0,15$ vs. DP $13,80 \pm 0,39$ g; $p < 0,05$; Fig. 8B); Adrenal direita (CT $22,40 \pm 1,60$ vs. DP $28 \pm 1,43$ mg; $p < 0,05$; Fig. 8C); Adrenal esquerda (CT $0,59 \pm 0,04$ vs. DP $0,96 \pm 0,05$ mg; $p < 0,05$; Fig. 8D) e Rim direito (CT $0,3 \pm 0,02$ vs. DP $1,54 \pm 0,04$ g; $p < 0,05$; Fig. 8E). Dentre os órgãos analisados, apenas o rim esquerdo não apresentou um aumento significativo da sua massa (Figura 8F).

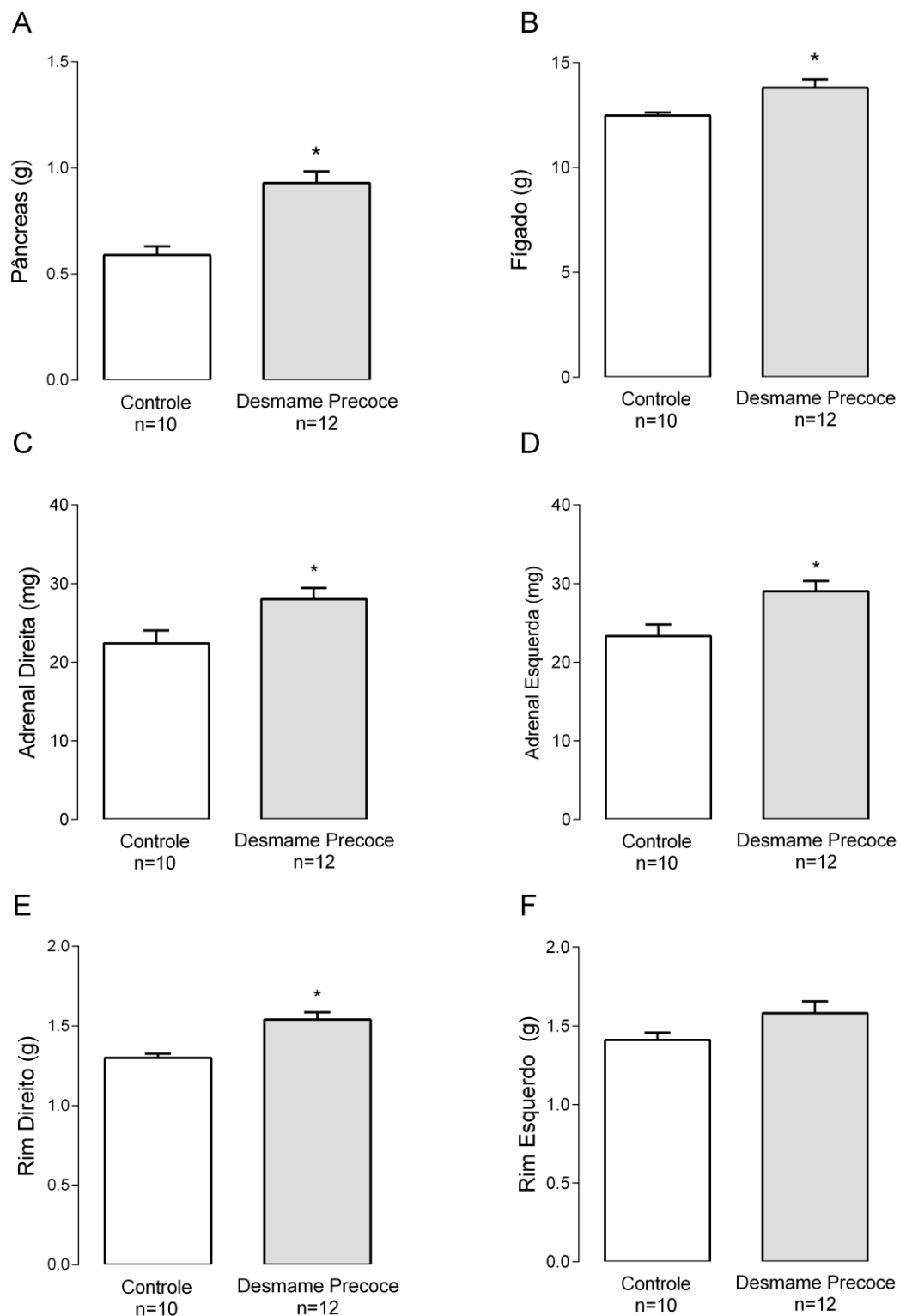


Figura8: Efeito do desmame precoce sobre a massa dos órgãos. (A) Pâncreas, (B) Fígado, (C) Adrenal Direita, (D) Adrenal Esquerda, (E) Rim Direito e (F) Rim Esquerdo. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por teste *t* de Student não pareado. O nível de significância foi fixado em $*p < 0,05$.

4.3 Alterações Pressóricas e Taquicárdicas Induzidas Pelo Desmame Precoce

Os animais submetidos ao desmame precoce, apresentaram, durante a avaliação dos parâmetros cardiovasculares, um aumento significativo da Pressão Arterial Média (CT $101,9 \pm 0,24$ vs. DP $107,1 \pm 0,4$ mmHg; $p < 0,05$; Fig. 9A), Frequência Cardíaca (CT $355,8 \pm 2,19$ vs. DP $381 \pm 1,75$ bpm; $p < 0,05$; Fig. 9B), Pressão Sistólica (CT $119,4 \pm 0,01$ vs DP $137,7 \pm 0,36$ mmHg; $p < 0,05$; Fig. 9C) e Pressão Diastólica (CT $81,56 \pm 0,22$ vs. DP $94,23 \pm 0,33$ mmHg; $p < 0,05$; Fig. 9D).

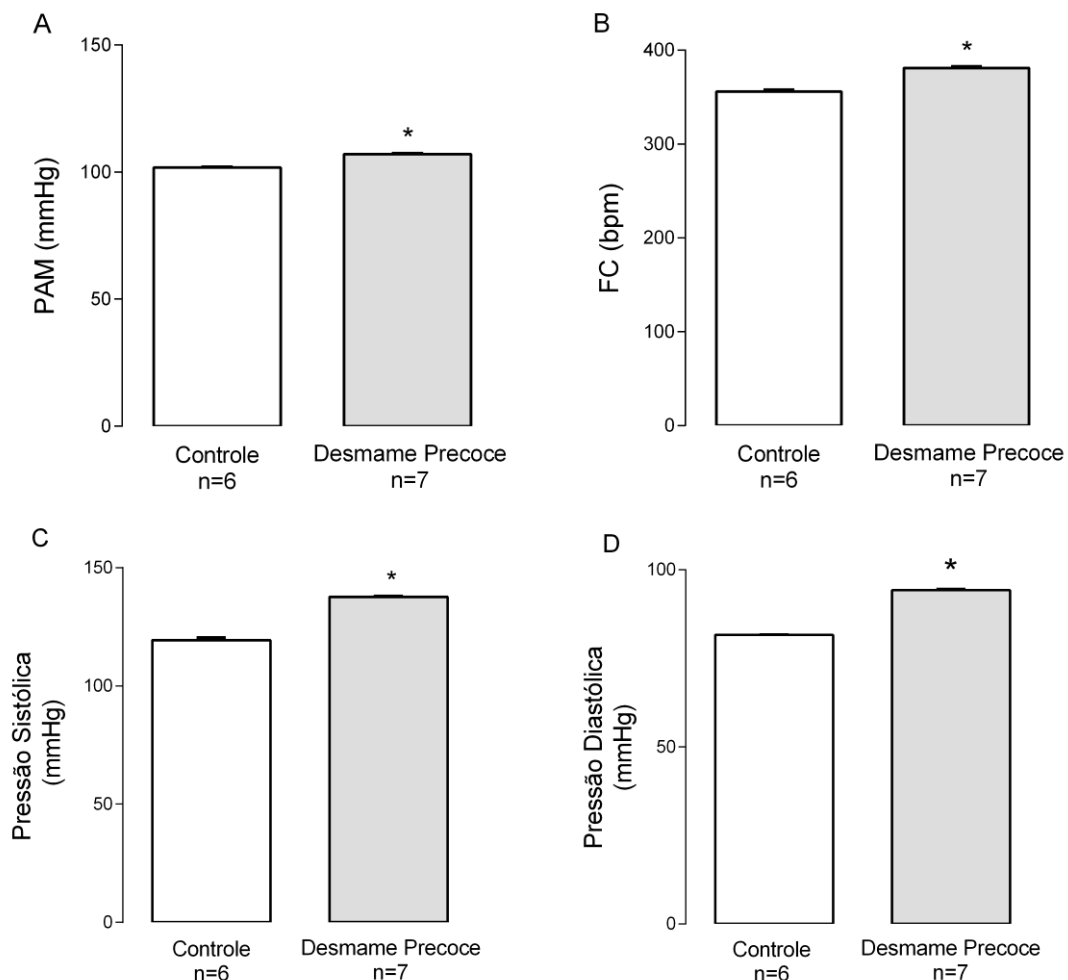


Figura9: Alterações dos parâmetros pressóricos e taquicárdicos induzidos pelo desmame precoce. Pressão Arterial Média (A), Frequência Cardíaca (B), Pressão Arterial Sistólica (C) e Pressão Arterial Diastólica (D). Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por teste *t* de Student não pareado. O nível de significância foi fixado em $*p < 0,05$.

4.4 Influência do Desmame Precoce na Função Ventricular Esquerda em Corações Isolados

Na tabela 5 estão expressos os valores basais da função ventricular esquerda dos corações isolados de ratos oriundos de ambos os grupos experimentais. Os corações isolados dos animais DP apresentaram um aumento significativo da PIVD e uma acentuada redução do fluxo coronariano.

Tabela 5: Parâmetros basais da função ventricular esquerda em corações isolados de ratos submetidos ao desmame precoce.

Parâmetros Basais	Controle	DP
FC	222,8 ± 5,4	228,5 ± 6,6
PIVS	162,6 ± 15,5	148,8 ± 13,30
PIVD	7,83 ± 0,5	10,29 ± 0,7 *
dp/dt Max	2979 ± 261	2735 ± 246
dp/dt min	2428 ± 247	2328 ± 196
Fluxo Coronariano	15,57 ± 0,8	13 ± 0,5 *
Fibrilação	21,67 ± 12,42	44,5 ± 9,71

FC, frequência cardíaca; PIVS, pressão intraventricular sistólica; PIVD, pressão intraventricular diastólica. (n= 8 – 7). Os dados foram expressos em média ± erro padrão da média (EPM) e analisados por teste *t* de Student não pareado. O nível de significância foi fixado em *p<0,05.

Durante o período de reperfusão, após 15 minutos de isquemia, os corações isolados dos animais do grupo DP apresentaram um aumento significativo do fluxo coronariano nos minutos 26 e 30 (Fig. 10 A). Durante a oclusão da artéria coronária descendente anterior esquerda e, posteriormente, reperfusão, não foram observadas alterações nos valores de pressão e frequência cardíaca quando os dois grupos foram comparados (Fig. 10B – F).

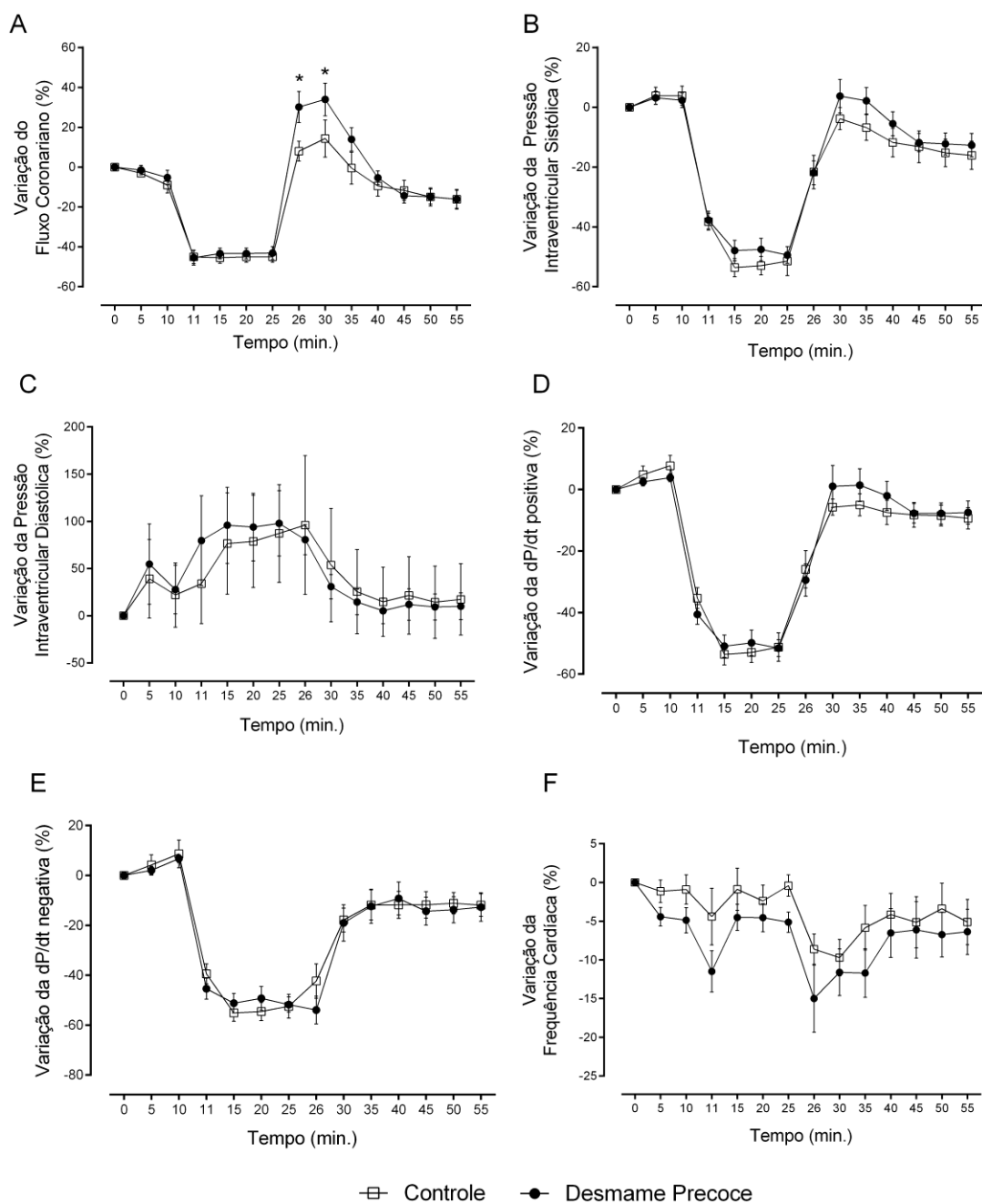


Figura 10: Variação em percentual dos valores obtidos durante o protocolo de isquemia-reperusão. (A) Fluxo coronariano; (B) PIVS; (C) PIVD; (D) dp/dt positiva. (E), dp/dt negativa. (F) frequência cardíaca. (n= 7 por grupo). Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por *TwoWayANOVA* seguido do pós-teste de Sidak de múltiplas comparações. Nível de significância foi fixado em $p < 0,05$.

4.5 Efeitos do Desmame Precoce Sobre a Massa e Morfologia Cardíaca

A massa do coração dos animais submetidos ao desmame precoce foi significativamente maior em relação ao grupo controle (CT $1,51 \pm 0,05$ vs. DP $1,77 \pm 0,06$ g; $p < 0,05$; Fig. 11)

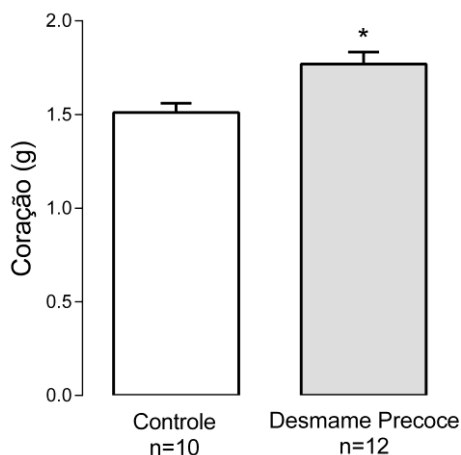


Figura 11: Efeito do desmame precoce sobre a massa cardíaca. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por teste *t* de Student não pareado. O nível de significância foi fixado em $*p < 0,05$.

Após avaliação das lâminas histológicas, observamos que os animais DP apresentaram, quando comparados ao grupo controle, um aumento significativo do diâmetro dos cardiomiócitos (CT $11,40 \pm 0,40$ vs. DP $13,22 \pm 0,27$ μm ; $p < 0,05$; Fig. 12 A – C) e da fibrose intersticial (CT $6,72 \pm 0,43$ vs. DP $9,65 \pm 0,67$ μm ; $p < 0,05$; Fig. 13 A – C). Não houve diferença estatística em relação a fibrose perivascular entre os dois grupos (Fig. 14 A – C).

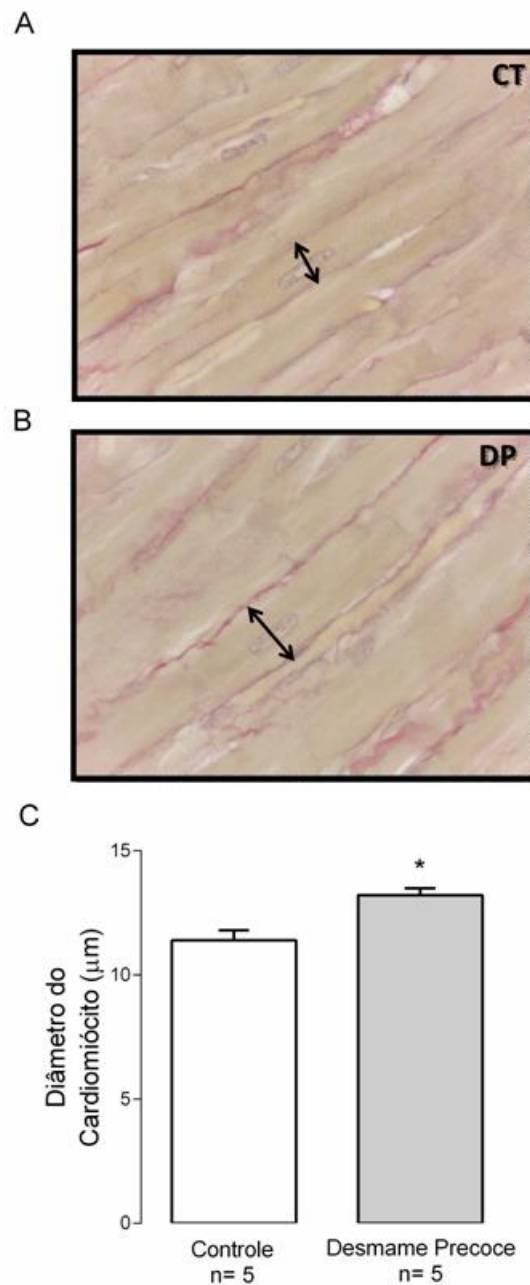


Figura12: Efeito do desmame precoce sobre o diâmetro dos cardiomiócitos. (A – B) Imagens representativas. (C) Quantificação do diâmetro de cardiomiócitos. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por teste *t* de Student não pareado. O nível de significância foi fixado em $*p < 0,05$.

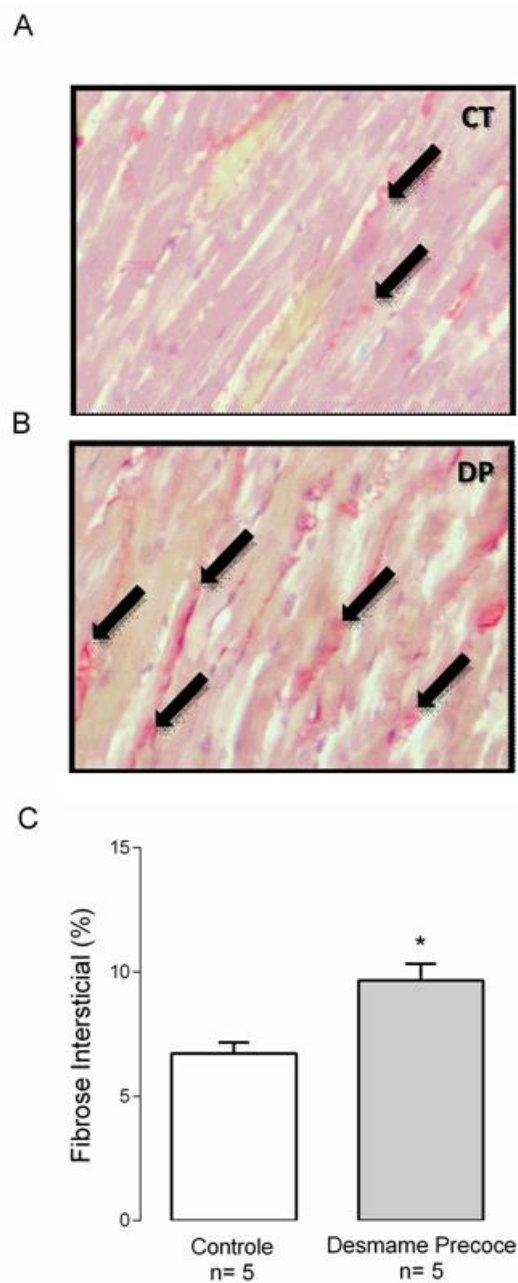


Figura 13: Efeito do desmame precoce sobre a deposição de colágeno intersticial. Imagens representativas (A – B). Quantificação de fibrose intersticial (C). Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por teste *t* de Student não pareado. O nível de significância foi fixado em $*p < 0,05$.

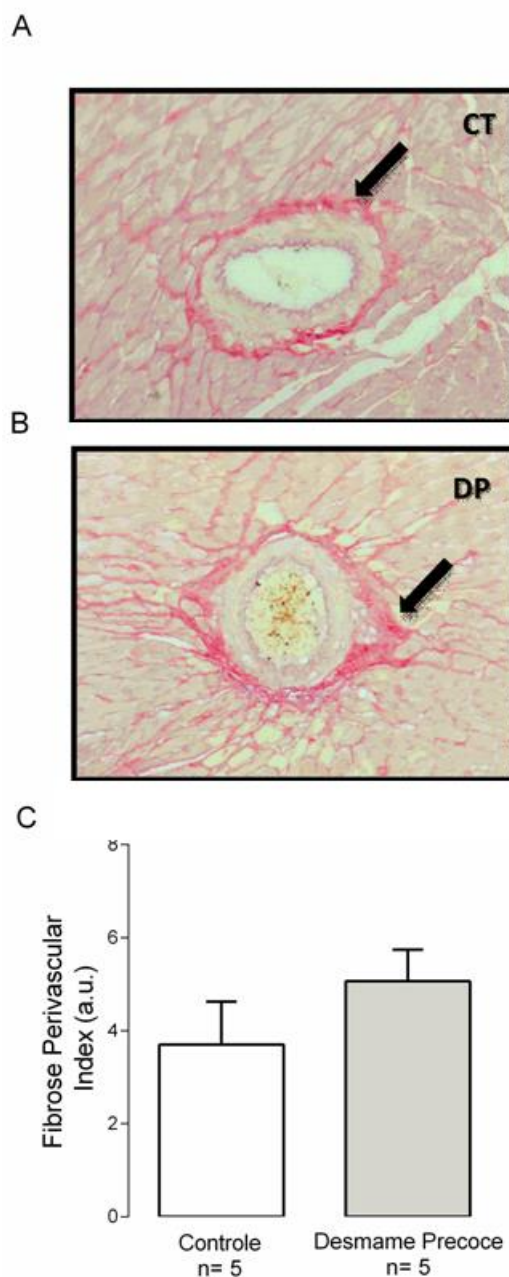


Figura 14: Efeito do desmame precoce sobre a deposição de colágenoperivascular. Imagens representativas (**A – B**). Quantificação de fibrose perivascular (**C**). Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por teste *t* de Student não pareado. O nível de significância foi fixado em $*p < 0,05$.

4.6 Influência do Desmame Precoce na Reatividade Vascular Aórtica

O relaxamento dependente de endotélio, induzido por ACh, foi potencializado nos anéis de aorta dos animais submetidos ao DP (Fig 15A). Durante a curva crescente de NPS, nos vasos sem endotélio, foi observado um maior relaxamento do grupo DP em relação ao grupo CT (Fig. 15B). A

constrição, induzida por fenilefrina, não apresentou diferença estatística quando os grupos foram comparados (Fig. 15 C).

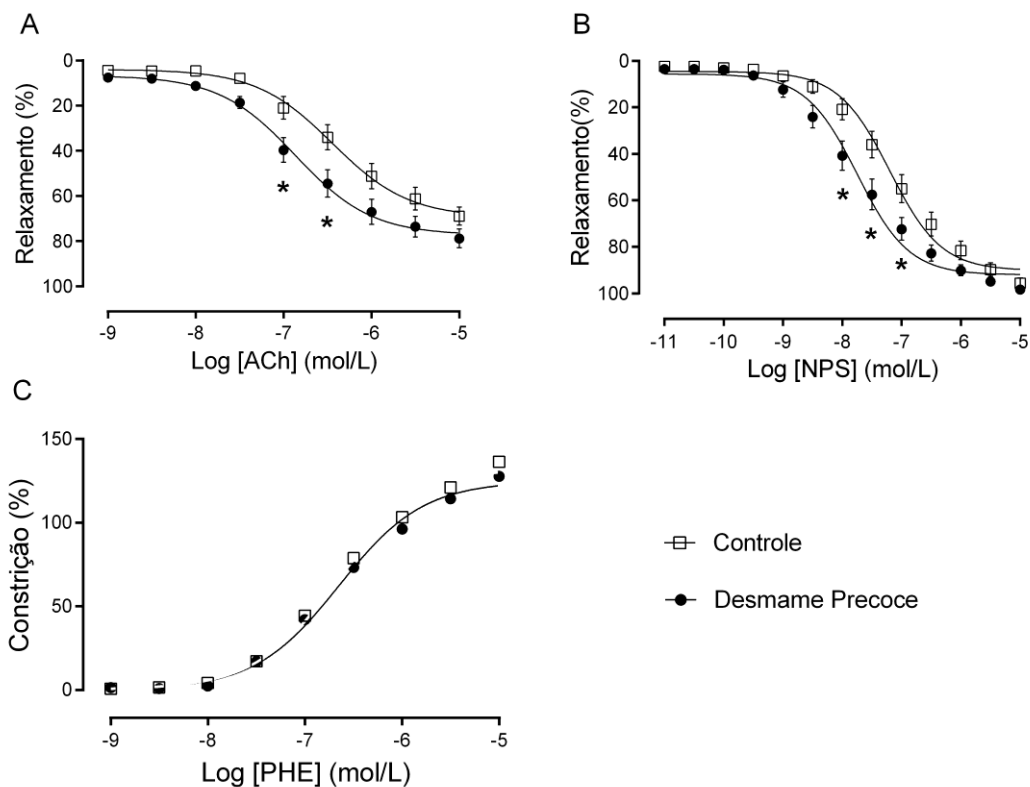


Figura 15: Efeito do desmame precoce na reatividade vascular aórtica. **(A)** Relaxamento induzido por ACh. **(B)** Relaxamento induzido por NPS. **(C)** Constrição induzida por PHE. Os anéis de aorta foram pré-contraídos com Fenilefrina. (n= 6 por grupo). Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média e analisados por *Two Way ANOVA* seguido pelo pós-teste de Sidak de múltiplas comparações. O nível de significância foi fixado em * $p < 0,05$.

4.7 Efeito do desmame precoce sobre a expressão proteica dos receptores do SRA

Os resultados obtidos a partir da técnica de *western blot* demonstraram os efeitos do DP sob o SRA. O DP promoveu uma redução significativa na expressão das proteínas do receptor AT1, quando comparado ao grupo CT (CT $100 \pm 6,3$ % vs. DP $72,2 \pm 1,6$ %; $p < 0,05$; Fig. 16 A), além da redução da expressão do receptor MAS (CT 100 ± 10 % vs. DP $70,27 \pm 3$ %; $p < 0,05$; Fig.

16 C). Não foram observadas alterações significativas em relação às proteínas do receptor AT2 quando os grupos foram comparados (Fig. 16 B).

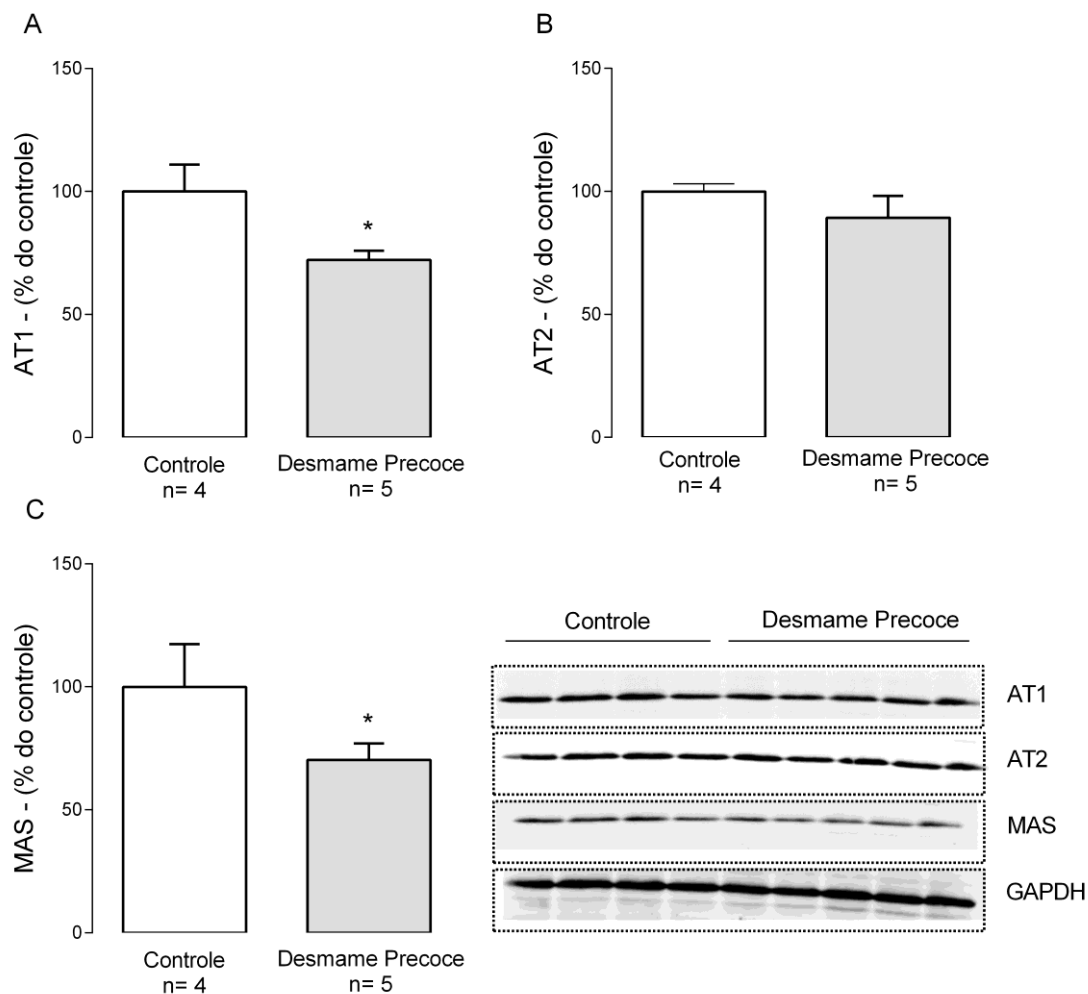


Figura 16: Efeito do desmame precoce sobre a expressão proteica dos receptores AT1, AT2 e MAS avaliada pela técnica de western blot em corações de ratos submetidos ao DP. **(A)** Expressão de AT1. **(B)** Expressão de AT2. **(C)** Expressão de MAS. Todas as proteínas foram normalizadas pela densidade do GAPDH. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por teste *t* de Student não pareado. O nível de significância foi fixado em $*p < 0,05$.

4.8 Efeito do desmame precoce sobre a expressão proteica da Akt e pAkt

Os animais do grupo DP apresentaram significativa redução da expressão de Akt em relação aos animais do grupo CT (CT $100 \pm 4,45$ % vs. DP $76,81 \pm 3,25$ %; $p < 0,05$; Fig. 17 A). O DP não foi capaz de promover alterações significativas na expressão de pAkt entre os grupos (Fig. 17 B).

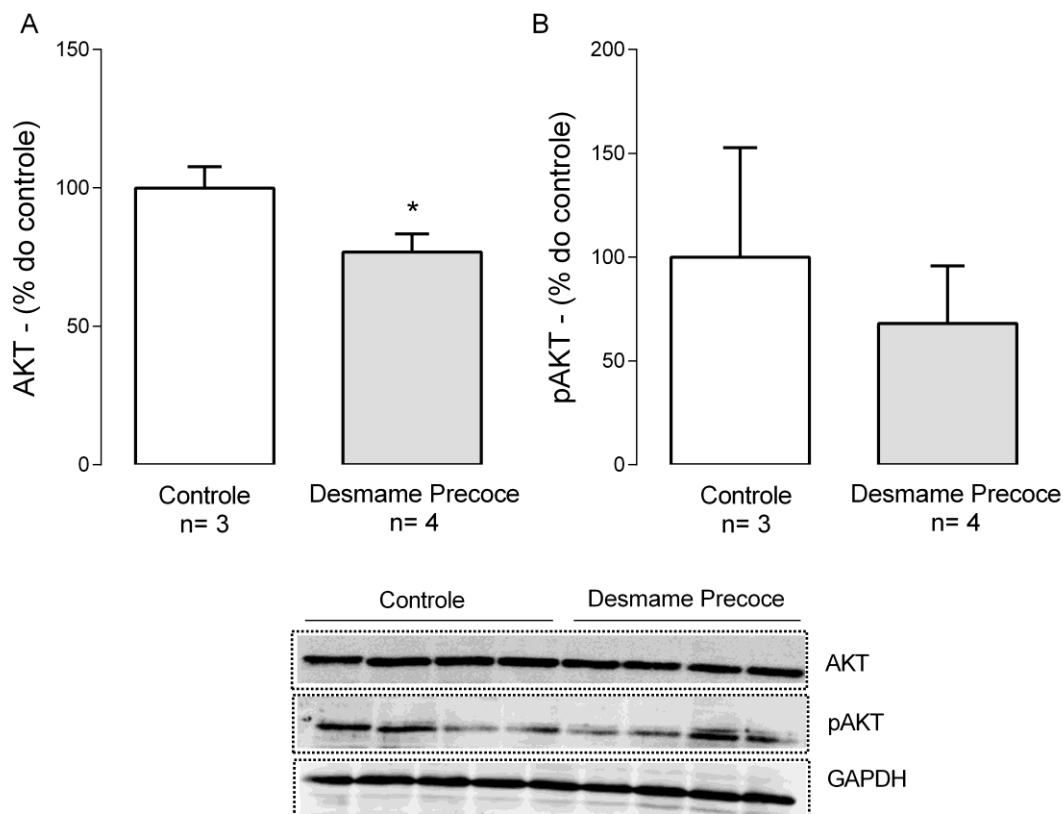


Figura 17: Efeito do desmame precoce sobre a expressão das proteínas Akt e pAkt avaliada pela técnica de western blot em corações de ratos submetidos ao DP. **(A)** Expressão de Akt. **(B)** Expressão de pAkt. As proteínas foram normalizadas pela densidade do GAPDH. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por teste *t* de Student não pareado. O nível de significância foi fixado em $*p < 0,05$.

4.9 Efeito do desmame precoce sobre a expressão proteica da enzima Superóxido Dismutase (SOD)

Os animais do grupo DP apresentaram uma redução significativa na expressão de proteínas da enzima antioxidante SOD quando comparados ao grupo CT (CT $100 \pm 12,33$ % vs. DP $62,78 \pm 4,01$ %; $p < 0,05$; Fig. 18).

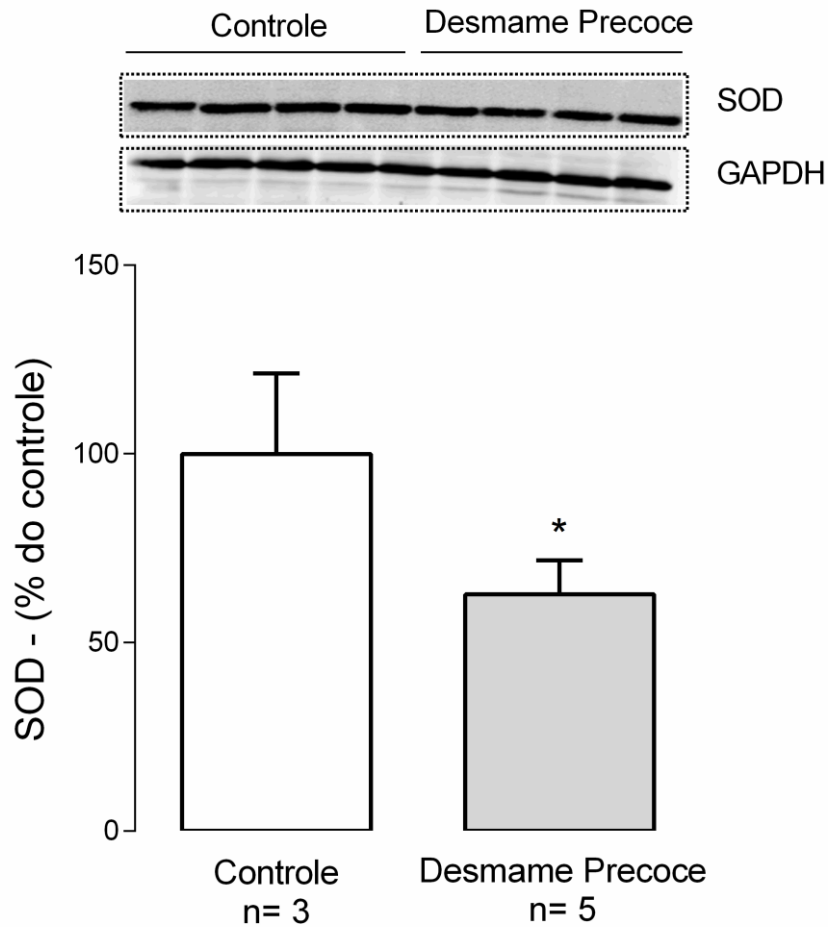


Figura 18: Efeito do desmame precoce sobre a expressão de proteínas da SOD avaliada pela técnica de western blot em corações de ratos submetidos ao DP. As proteínas foram normalizadas pela densidade do GAPDH. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por teste *t* de Student não pareado. O nível de significância foi fixado em $*p < 0,05$.

4.10 Efeito do desmame precoce sobre a expressão do receptor GHS-R1a

A expressão de proteínas do receptor de grelina, subtipo 1a, não apresentou diferença estatística entre os grupos (Fig. 19).

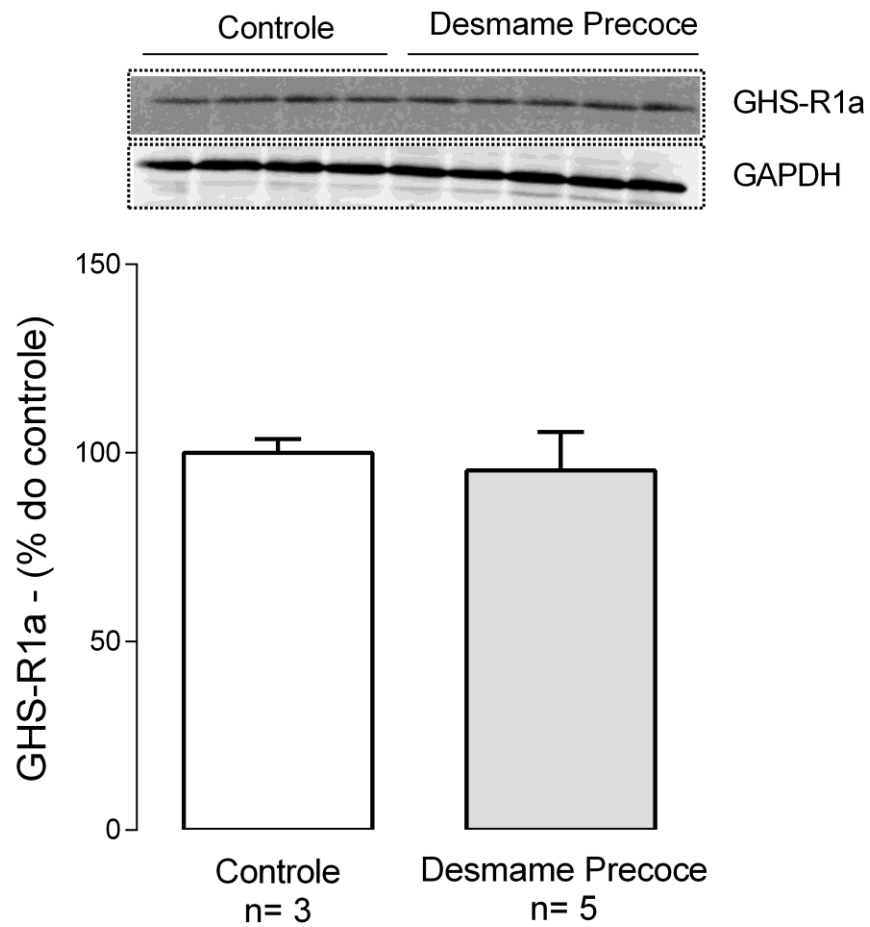


Figura 19: Efeito do desmame precoce sobre a expressão de proteínas de GHS-R1a avaliada pela técnica de western blot em corações de animais submetidos ao DP. As proteínas foram normalizadas pela densidade do GAPDH. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por teste *t* de Student não pareado. O nível de significância foi fixado em $*p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

Os principais achados deste trabalho foram: i) o DP farmacológico induzido por bromocriptina em ratos resulta em obesidade na vida adulta; ii) Os animais submetidos ao DP apresentaram um aumento significativo da PA e FC; iii) nos animais do grupo DP, foi observado hipertrofia cardíaca e fibrose intersticial; iv) houve uma acentuada redução do fluxo coronariano nos animais submetidos ao DP e, posteriormente, um aumento do fluxo durante a reperfusão; v) redução da expressão de proteínas dos receptores AT1 e MAS, da enzima antioxidante SOD e da expressão da Proteína Quinase B (Akt), no coração dos ratos submetidos ao DP.

De acordo com a OMS, a amamentação exclusiva durante os 6 primeiros meses de vida é de fundamental importância para saúde da criança [1]. Dentre os componentes presentes no leite materno, se encontram nutrientes, hormônios e anticorpos, que auxiliarão no desenvolvimento nutricional e imunológico [4]. Apesar da importância do leite materno, apenas 35% dos bebês são exclusivamente amamentados durante os 4 primeiros meses de vida [1].

O desmame é um processo gradual e natural caracterizado pela redução da alimentação por leite e introdução de alimentação complementar [21]. Alterações nutricionais, hormonais, psicológicas, dentre outras, durante períodos críticos da vida, como gestação e lactação, são capazes de promover um fenômeno conhecido como programação. A programação ocorre por alterações epigenéticas que são definidas como modificação da expressão gênica, à nível de cromatina, sem alterações na sequência de DNA, que pode ser transmitida hereditariamente [85].

Estudos evidenciaram que a programação resultante do desmame precoce, culmina em desnutrição no período neonatal [27]. Além disso, efeitos do desmame precoce foram observados na vida adulta com alterações no peso corporal, dislipidemia, resistência à insulina, resistência à leptina, hiperleptinemia, hipotireoidismo central, dentre outras [27-28, 86].

Em nosso estudo, os animais do grupo DP apresentaram uma redução do peso corporal nos últimos 3 dias de lactação. Apesar dos filhotes possuírem capacidade fisiológica e motora para se alimentarem da ração disponível nas

caixas, o encurtamento do período de lactação pode ser um fator preponderante na gênese da desnutrição no período neonatal.

Corroborando os dados da literatura, na idade adulta, a partir dos 140 dias de vida, os animais DP apresentaram um aumento significativo do peso corporal em relação ao grupo CT. Segundo Bonomo e colaboradores (2008), a hipoprolactenimia materna, induzida por bromocriptina, no final do período de lactação, culminou no maior peso corporal da prole na vida adulta [87]. Animais induzidos ao desmame precoce farmacológico, apresentam, dentre outras alterações, hipotireoidismo central, possivelmente devido à redução da secreção do hormônio liberador de tireotrofina (TRH) [87]. Sabe-se que a leptina estimula a produção e secreção de TRH, além do hormônio estimulante da Tireóide (TSH), e provavelmente, a resistência central à leptina seja responsável pela redução dos níveis de TSH nesse grupo de animais [87-88]. Sendo assim, a redução da função da tireóide, amplamente descrita como reguladora da termogênese e taxa metabólica basal, pode ser a responsável pelo estado hipometabólico na vida adulta, contribuindo para a obesidade visualizada no presente trabalho. Um fator importante que antecede o início da obesidade é a inflamação hipotalâmica [89]. Rapozo-Younes e colaboradores (2015) evidenciaram, em animais submetidos ao DP farmacológico, inflamação em núcleos hipotalâmicos como Núcleo Arqueado (ARC), Paraventricular (PVN) e Hipotálamo lateral (LH) [28].

As alterações fisiológicas descritas acima podem estar associadas à obesidade, observada na vida adulta, dos animais programados pelo DP farmacológico.

A obesidade pode desencadear uma ampla variedade de alterações fisiológicas potencialmente fatais, como *diabetes mellitus* tipo II, doença coronariana, insuficiência cardíaca, hipertensão, infertilidade, cânceres, dentre outras [90]. Observamos, no presente trabalho, um aumento significativo da pressão arterial e da frequência cardíaca nos animais obesos que foram submetidos ao desmame precoce. Apesar da íntima relação entre obesidade e hipertensão, muitos mecanismos através dos quais a obesidade desencadeia a hipertensão necessitam ser elucidados. No entanto, postula-se que haja uma contribuição significativa do Sistema Renina-Angiotensina, atividade

exacerbada do Sistema Nervoso Simpático (SNS) e aumento da reabsorção renal de sódio [59].

A atividade do SNS na gênese da hipertensão relacionada a indivíduos obesos vem sendo amplamente estudada. Estudos evidenciaram que o aumento da ingestão calórica culmina em um aumento de noradrenalina em tecidos periféricos [91]. Além disso, o excesso de gordura e carboidrato presentes na dieta é capaz de estimular a atividade de receptores adrenérgicos, inferindo um aumento da atividade simpática e hipertensão [92]. Em contrapartida, em animais alimentados com grandes quantidades de gordura, o bloqueio de receptores adrenérgicos atenuou de maneira significativa o aumento da pressão arterial [61]. Interessantemente, estudos evidenciaram que a obesidade não é capaz de promover uma ativação em massa do SNS e que, possivelmente, os nervos simpáticos renais são os responsáveis por todos os efeitos crônicos da ativação do SNS na pressão arterial na obesidade [93]. Em indivíduos obesos, a atividade simpática cardíaca não é alterada e, possivelmente, o aumento da FC visualizado em nosso estudo pode ter ocorrido devido a uma redução da atividade parassimpática no coração [94].

Como já descrito, animais submetidos ao desmame precoce farmacológico apresentam hiperleptinemia na vida adulta. Além de ser um importante hormônio no controle do apetite e metabolismo, a leptina possui função moduladora do SNS [95]. Este hormônio peptídico é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e se ligar aos seus receptores expressos em diversas áreas do SNC, incluindo regiões hipotalâmicas e do tronco cerebral, promovendo a ativação de vias responsáveis pela redução do apetite, aumento do gasto energético e aumento da atividade do SNS [96]. Porém, indivíduos obesos apresentam resistência central à leptina, fator que pode potencializar o ganho de peso [97]. Estudos evidenciaram, em humanos e camundongos, que uma redução dos níveis de leptina está correlacionada com a obesidade e que a administração de leptina é capaz de induzir o aumento da pressão arterial devido ao aumento do fluxo simpático para os rins [98]. Além disso, foi observado que o efeito hipertensivo evocado pela leptina pode ser potencializado pela redução de Óxido Nítrico (NO), bastante comum em indivíduos obesos com disfunção endotelial [99]. Por fim, animais obesos com

deficiência de leptina, não apresentaram hipertensão [62], demonstrando assim, uma estreita relação entre este hormônio e a hipertensão na obesidade. Apesar da ausência de dados relacionados à modulação autonômica e dosagem de leptina em nosso estudo, hipotetizamos que o aumento da PA visualizado nos animais obesos é, em parte, orquestrado pela hiperatividade simpática induzida pelo aumento dos níveis de leptina.

Além da hiperleptinemia visualizada em diversos estudos, a redução da tolerância à glicose, hiperinsulinemia e resistência à insulina são disfunções marcantes na obesidade [28, 60]. Adicionalmente, animais submetidos ao DP, apresentaram, na vida adulta, hiperinsulinemia e resistência à insulina [28]. Ambas as alterações fisiológicas podem estar relacionadas com o aumento da pressão arterial observado em nosso estudo. Dentre os possíveis efeitos da hiperinsulinemia na gênese da hipertensão no estado obeso, podemos citar o aumento da reabsorção renal de sódio [100] e estimulação do SNS [101]. Segundo Sechi (1999), a insulina participa da regulação de sódio diretamente nos túbulos renais e um aumento acentuado de sódio, devido a hiperinsulinemia, pode acarretar no aumento da pressão arterial [63].

O Sistema Renina-Angiotensina, apresenta, potencialmente, mecanismos fundamentais relacionados às alterações cardiovasculares observadas em nosso trabalho. Diversos estudos demonstraram que os níveis aumentados de componentes do SRA, como renina, angiotensinogênio, Ang II e aldosterona, são características comuns na obesidade. Uma vez que, na obesidade, há um aumento do volume plasmático, a ativação do SRA, e conseqüentemente da secreção de renina, se devem às alterações histológicas na medula renal [102]. Além disso, a hipertrofia dos adipócitos, visualizada em indivíduos obesos, promove uma maior atividade do SRA que, através da Ang II via receptor AT1, eleva a pressão arterial [103].

As alterações cardiovasculares, *in vivo*, no nosso estudo, sugerem uma participação fundamental dos hormônios leptina e insulina na simpatoexcitação e aumento da reabsorção de sódio, bem como a atividade exacerbada do SRA, especialmente a atividade da Ang II.

Além das alterações cardiovasculares *in vivo*, verificamos em nosso estudo, durante o protocolo de coração isolado, alterações significativas do fluxo coronariano nos animais submetidos ao DP. Diversos estudos

demonstraram que há uma estreita relação entre obesidade e doença arterial coronariana [104-106], porém, os mecanismos exatos entre ambas não foram completamente elucidados. Adicionalmente, indivíduos obesos e hipertensos apresentam uma redução da vasodilatação dependente de endotélio [107] e, em animais, o controle da hipertensão arterial, está relacionado à melhora da função endotelial [108]. Sabe-se que na obesidade ocorre o aumento de agentes pró-inflamatórios, aterogênicos e substâncias, tais como endotelina e tromboxano, que promovem a vasoconstrição, contribuindo assim, para a disfunção endotelial e inflamação vascular [109]. O endotélio é capaz de regular a secreção de fatores vasodilatadores, como NO, prostaciclina e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio [110]. Dentre os fatores citados, o NO é um dos mais importantes e melhor caracterizado [109]. A disfunção endotelial, e conseqüentemente o comprometimento do relaxamento dependente do endotélio causado pela redução da atividade do NO, pode ser o mecanismo responsável pela redução do fluxo coronariano basal observada nos animais desmamados precocemente em nosso estudo.

Interessantemente, no presente trabalho, verificamos o aumento do fluxo coronariano nos animais submetidos ao DP na fase de reperfusão. Uma ampla variedade de processos enzimáticos e metabólicos é modificada durante a ausência de oxigênio. Neste período, a célula obtém energia a partir do metabolismo anaeróbico, resultando em acidose láctica [111]. O meio ácido se torna inadequado para a cinética enzimática, reduzindo os mecanismos celulares para manutenção da homeostase [111]. Além disso, há um acúmulo de cálcio, que por sua vez, provoca disfunção da membrana mitocondrial e lesão irreversível. Apesar da importância da restauração do fluxo sanguíneo, a reperfusão culmina em graves alterações metabólicas e lesão tecidual [112]. Para explicar o aumento do fluxo coronariano observado durante a reperfusão, nos animais do grupo DP, experimentos adicionais serão necessários. Porém, hipotetizamos que há um mecanismo compensatório vasodilatador frente à hipermia reativa na artéria coronária.

As alterações pressóricas e taquicárdicas visualizadas nos experimentos *in vivo* no presente trabalho, não foram visualizadas no protocolo de coração isolado, sugerindo, portanto, que o DP farmacológico não altera estes parâmetros de maneira direta no coração.

Curiosamente, nos anéis de aorta isolados de animais submetidos ao DP, observamos um aumento do relaxamento dependente de endotélio, com ACh, e independente de endotélio, com NPS. Além disso, não foram observadas alterações significativas entre os grupos durante a vasoconstrição induzida por fenilefrina. Apesar das diferenças anatomo-fisiológicas entre as artérias aorta e coronária, os resultados apresentados sugerem que há respostas similares frente ao DP farmacológico.

Após observarmos as alterações cardiovasculares descritas, e sabendo que uma importante consequência da hipertensão é a hipertrofia cardíaca e degradação da matriz celular com deposição de colágeno, [113-114], nesse sentido avaliamos se o DP farmacológico altera a morfologia do ventrículo esquerdo observada na vida adulta. Verificamos que os animais do grupo DP apresentaram um aumento significativo do diâmetro dos cardiomiócitos, além do aumento da deposição de colágeno intersticial. O remodelamento cardiovascular e hipertrofia cardíaca estão intimamente relacionados com o aumento da PA e podem resultar em doenças cardiovasculares induzidas por alterações estruturais e fisiológicas permanentes [115]. Um dos principais mecanismos envolvidos em tais alterações é o SRA. Sabe-se que os receptores de Ang II tipo 1 são amplamente expressos no tecido cardíaco e sua ativação estimulam cascatas pró-inflamatórias, crescimento e proliferação celular, resultando em remodelamento cardíaco e desenvolvimento de fibrose [116]. Em contrapartida, o peptídeo Ang-(1-7), via receptor MAS, exerce ações opostas à Ang II, como efeitos vasodilatadores, antifibrótico e anti-hipertrofico [117]. Curiosamente, a expressão protéica dos receptores AT1 e MAS foram significativamente reduzidas no tecido cardíaco dos animais submetidos ao DP farmacológico. Possivelmente, os níveis de Ang II, e consequentemente Ang-(1-7), estão alterados nesse grupo de animais. Sendo assim, ambos os receptores acoplados a proteína G, podem ter sofrido uma dessensibilização e internalização, culminando na redução de suas expressões. Em nosso estudo, não verificamos alterações na expressão proteica de receptores AT2, sugerindo, assim, que os efeitos benéficos de tal receptor, como efeitos antifibrótico e anti-proliferativo[118], não foram capazes de atenuar as alterações morfológicas visualizadas. Entendemos que uma das limitações de nosso estudo é não termos dosado os níveis plasmáticos dos hormônios Ang II

e Ang-(1-7), ou realizarmos desafios farmacológicos com os referidos hormônios em corações isolados, mostrando fisiologicamente possíveis alterações em resposta a esses hormônios.

Após observarmos as alterações na expressão de proteínas do SRA, decidimos avaliar se a expressão da enzima antioxidante SOD estava alterada nos animais submetidos ao DP farmacológico. Verificamos, assim, uma redução significativa na expressão proteica de tal enzima. As espécies reativas de oxigênio (EROS), provenientes do metabolismo oxidativo, se formam de maneira natural em nosso organismo e o desequilíbrio entre as EROS e o sistema antioxidante culmina em uma condição conhecida como estresse oxidativo (EO) [119]. Estudos evidenciaram que as espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio, estão aumentadas na hipertensão [120]. Além disso, sabe-se que o EO exerce um papel preponderante no remodelamento cardíaco através de seus efeitos deletérios em componentes celulares, alterações no metabolismo energético, alterações de vias de sinalização, dentre outras [121]. O EO é contrabalanceado pelo sistema antioxidante, que por sua vez, é dividido em dois grupos, não enzimático e enzimático [122]. A SOD, pertencente ao grupo enzimático do sistema antioxidante, é responsável pela dismutação de O_2^- em peróxido de hidrogênio e é caracterizada como a primeira linha de defesa contra os radicais livres [123]. Segundo Kinnula e colaboradores (2004), a expressão aumentada da SOD está correlacionada com a redução da hipertrofia e proliferação celular [124]. Sendo assim, hipotetizamos que a redução da expressão proteica de tal enzima possivelmente esteja relacionada com as alterações morfológicas visualizadas em nosso estudo.

Além das alterações das expressões das proteínas supracitadas, verificamos que a expressão da Akt, nos corações dos animais submetidos ao DP, se encontra reduzida. Estudos demonstraram que diferentes vias de sinalizações intracelulares são ativadas durante alterações histológicas e aumento da massa do ventrículo esquerdo. Dentre as vias de sinalização de insulina mediadas pelo seu receptor, se encontra a via da Akt. Segundo Orcy e colaboradores (2008), o aumento da expressão de tal proteína pode estar relacionado como o crescimento celular [125]. Porém, devido a redução da expressão da Akt visualizada em nosso estudo, hipotetizamos que outras

proteínas, como a ERK 1/2, estejam envolvidas nos mecanismos pró-fibróticos do miocárdio.

O hormônio peptídico grelina, sabidamente regula diversas funções biológicas, como apetite, balanço energético, metabolismo de glicose e gordura, dentre outras [126]. Sabe-se que o receptor de grelina, GHS-R1a, é amplamente expresso neste sistema e sua ativação, pela administração exógena de grelina, exibe um padrão cardioprotetor, como vasodilatação, melhora na função endotelial, proteção contra lesão de isquemia/reperfusão e inibição da apoptose das células cardíacas [56, 127]. Em nosso trabalho, não observamos alterações significativas na expressão proteica do GHS-R1a. Portanto, inferimos que o DP farmacológico não modifica o eixo cardioprotetor regulado pela grelina e seu receptor expressos no coração.

Os resultados apresentados nesse estudo mostram, pela primeira vez, que o DP farmacológico, além de promover o desenvolvimento de um fenótipo obeso, com significativo aumento da adiposidade e da massa corporal, também promove alterações na fisiologia cardiovascular. Esses achados são fundamentais no melhor entendimento da fisiopatologia das doenças cardiovasculares ligadas ao conceito DOHaD (Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença), sobretudo relacionadas a obesidade e a nutrição neonatal. Recomendamos que estudos posteriores sejam realizados com o intuito de investigar se as alterações cardiovasculares observadas nesse estudo, surgem já na infância, imediatamente após o desmame, ou se são manifestadas tardiamente na idade adulta, como consequência de outros distúrbios fisiológicos, como o aumento da adiposidade. Além disso, experimentos deverão ser realizados a fim de investigar os possíveis mecanismos envolvidos nas alterações da PA observada no presente trabalho. Ressaltamos que a própria ação da bromocriptina, diretamente nos filhotes, passando através do leite, pode ter contribuído para o desenvolvimento das disfunções observadas. Dessa forma, entendemos que em estudos subsequentes também sejam usados outros modelos de DP, como os que citamos aqui.

6. CONCLUSÃO

Reconhecidas as possíveis limitações desse estudo, podemos concluir, diante dos dados mostrados, que o desmame precoce farmacológico induzido por BRO causa adaptações fisiológicas deletérias ao sistema cardiovascular. De fato, o aumento da PA associado ao remodelamento cardíaco e a diminuição da expressão do AT1 e MAS, são evidências significativas que o DP farmacológico causa programação cardiometabólica com a manifestação de disfunções cardiovasculares na idade adulta de ratos.

7. REFERÊNCIAS

1. Arena Ansotegui, J., [*Breastfeeding in the "global strategy for infant and young child feeding"*]. *An Pediatr (Barc)*, 2003. **58**(3): p. 208-10.
2. Schwarz, E.B., et al., *Duration of lactation and risk factors for maternal cardiovascular disease*. *Obstet Gynecol*, 2009. **113**(5): p. 974-82.
3. Cope, M.B. and D.B. Allison, *Critical review of the World Health Organization's (WHO) 2007 report on 'evidence of the long-term effects of breastfeeding: systematic reviews and meta-analysis' with respect to obesity*. *Obes Rev*, 2008. **9**(6): p. 594-605.
4. Andreas, N.J., B. Kampmann, and K. Mehring Le-Doare, *Human breast milk: A review on its composition and bioactivity*. *Early Hum Dev*, 2015. **91**(11): p. 629-35.
5. Kojima, S., et al., *Maternal contact differentially modulates central and peripheral oxytocin in rat pups during a brief regime of mother-pup interaction that induces a filial huddling preference*. *J Neuroendocrinol*, 2012. **24**(5): p. 831-40.
6. Walker, C.D., et al., *Mother to infant or infant to mother? Reciprocal regulation of responsiveness to stress in rodents and the implications for humans*. *J Psychiatry Neurosci*, 2004. **29**(5): p. 364-82.
7. Marler, P., *Innateness and the instinct to learn*. *An Acad Bras Cienc*, 2004. **76**(2): p. 189-200.
8. Matsui, F., et al., *Effects of stress of postnatal development on corticosterone, serotonin and behavioral changes*. *Brain Dev*, 2010. **32**(7): p. 517-23.
9. Morgane, P.J., et al., *Prenatal malnutrition and development of the brain*. *Neurosci Biobehav Rev*, 1993. **17**(1): p. 91-128.
10. Dobbing, J., *The Influence of Early Nutrition on the Development and Myelination of the Brain*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1964. **159**: p. 503-9.
11. Owen, C.G., et al., *Effect of infant feeding on the risk of obesity across the life course: a quantitative review of published evidence*. *Pediatrics*, 2005. **115**(5): p. 1367-77.

12. Marseglia, L., et al., *Obesity and breastfeeding: The strength of association*. *Women Birth*, 2015. **28**(2): p. 81-6.
13. Gahagan, S., *Development of eating behavior: biology and context*. *J Dev Behav Pediatr*, 2012. **33**(3): p. 261-71.
14. Ravelli, G.P., Z.A. Stein, and M.W. Susser, *Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy*. *N Engl J Med*, 1976. **295**(7): p. 349-53.
15. Hales, C.N. and D.J. Barker, *The thrifty phenotype hypothesis*. *Br Med Bull*, 2001. **60**: p. 5-20.
16. Lucas, A., *Role of nutritional programming in determining adult morbidity*. *Arch Dis Child*, 1994. **71**(4): p. 288-90.
17. Fagundes, A.T., et al., *Maternal low-protein diet during lactation programmes body composition and glucose homeostasis in the adult rat offspring*. *Br J Nutr*, 2007. **98**(5): p. 922-8.
18. Fagundes, A.T., et al., *Temporal evaluation of body composition, glucose homeostasis and lipid profile of male rats programmed by maternal protein restriction during lactation*. *Horm Metab Res*, 2009. **41**(12): p. 866-73.
19. de Moura, E.G., et al., *Malnutrition during lactation changes growth hormone mRNA expression in offspring at weaning and in adulthood*. *J Nutr Biochem*, 2007. **18**(2): p. 134-9.
20. Vicente, L.L., et al., *Malnutrition during lactation in rats is associated with higher expression of leptin receptor in the pituitary of adult offspring*. *Nutrition*, 2004. **20**(10): p. 924-8.
21. Weissman, A.M., et al., *Pooled analysis of antidepressant levels in lactating mothers, breast milk, and nursing infants*. *Am J Psychiatry*, 2004. **161**(6): p. 1066-78.
22. Smith, F., et al., *Early weaning stress impairs development of mucosal barrier function in the porcine intestine*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2010. **298**(3): p. G352-63.
23. Townsend, E. and N.J. Pitchford, *Baby knows best? The impact of weaning style on food preferences and body mass index in early childhood in a case-controlled sample*. *BMJ Open*, 2012. **2**(1): p. e000298.

24. Mayer, J., et al., *Exercise, food intake and body weight in normal rats and genetically obese adult mice*. Am J Physiol, 1954. **177**(3): p. 544-8.
25. Koldovsky, O., *Response of the gastrointestinal tract to premature weaning in experimental animals*. Pediatrics, 1985. **75**(1 Pt 2): p. 199-206.
26. Ito, A., et al., *Effects of early weaning on anxiety and autonomic responses to stress in rats*. Behav Brain Res, 2006. **171**(1): p. 87-93.
27. Lima Nda, S., et al., *Early weaning causes undernutrition for a short period and programmes some metabolic syndrome components and leptin resistance in adult rat offspring*. Br J Nutr, 2011. **105**(9): p. 1405-13.
28. Younes-Rapozo, V., et al., *Early weaning by maternal prolactin inhibition leads to higher neuropeptide Y and astrogliosis in the hypothalamus of the adult rat offspring*. Br J Nutr, 2015. **113**(3): p. 536-45.
29. Tudzynski, P., T. Correia, and U. Keller, *Biotechnology and genetics of ergot alkaloids*. Appl Microbiol Biotechnol, 2001. **57**(5-6): p. 593-605.
30. BERALDO, C.F.V., I. M. F.; NAVES, M. M. V., *Nutrição, atividade física e obesidade em adultos: aspectos e recomendações para prevenção e tratamento*. Revista Médica de Minas Gerais, 2004. **(14)**: p. 57-62.
31. O.M.S., *Obesity and overweight*. Geneva: World Health Organization. 2014.
32. Martinez, J.A., *Body-weight regulation: causes of obesity*. Proc Nutr Soc, 2000. **59**(3): p. 337-45.
33. *Atlas Corações do Brasil*. Sociedade Brasileira de Cardiologia 2005.
34. Wanderley, E.M.F., V. A. , *Obesidade: uma perspectiva plural*. Ciência Saúde Coletiva, 2010. **(15)**: p. 185-194.
35. Stice, E., et al., *The contribution of brain reward circuits to the obesity epidemic*. Neurosci Biobehav Rev, 2013. **37**(9 Pt A): p. 2047-58.
36. Velkoska, E. and M.J. Morris, *Mechanisms behind early life nutrition and adult disease outcome*. World J Diabetes, 2011. **2**(8): p. 127-32.
37. de Moura, E.G. and M.C. Passos, *Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism*. Biosci Rep, 2005. **25**(3-4): p. 251-69.

38. Lins, M.C., et al., *Effects of maternal leptin treatment during lactation on the body weight and leptin resistance of adult offspring*. Regul Pept, 2005. **127**(1-3): p. 197-202.
39. Reseland, J.E., et al., *Effect of long-term changes in diet and exercise on plasma leptin concentrations*. Am J Clin Nutr, 2001. **73**(2): p. 240-5.
40. Pelleymounter, M.A., et al., *Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice*. Science, 1995. **269**(5223): p. 540-3.
41. Sandoval, D.A. and S.N. Davis, *Leptin: metabolic control and regulation*. J Diabetes Complications, 2003. **17**(2): p. 108-13.
42. Ahima, R.S., D. Prabakaran, and J.S. Flier, *Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function*. J Clin Invest, 1998. **101**(5): p. 1020-7.
43. Smith, J.T. and B.J. Waddell, *Leptin distribution and metabolism in the pregnant rat: transplacental leptin passage increases in late gestation but is reduced by excess glucocorticoids*. Endocrinology, 2003. **144**(7): p. 3024-30.
44. Schmidt, I., et al., *The effect of leptin treatment on the development of obesity in overfed suckling Wistar rats*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2001. **25**(8): p. 1168-74.
45. Mistry, A.M., A. Swick, and D.R. Romsos, *Leptin alters metabolic rates before acquisition of its anorectic effect in developing neonatal mice*. Am J Physiol, 1999. **277**(3): p. R742-7.
46. Briggs, D.I. and Z.B. Andrews, *Metabolic status regulates ghrelin function on energy homeostasis*. Neuroendocrinology, 2011. **93**(1): p. 48-57.
47. Kojima, M. and K. Kangawa, *Ghrelin: structure and function*. Physiol Rev, 2005. **85**(2): p. 495-522.
48. Sato, T., et al., *Structure, regulation and function of ghrelin*. J Biochem, 2012. **151**(2): p. 119-28.
49. Lu, S., et al., *Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus*. Neurosci Lett, 2002. **321**(3): p. 157-60.

50. Cowley, M.A., et al., *The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis*. *Neuron*, 2003. **37**(4): p. 649-61.
51. Muller, T.D., et al., *Ghrelin*. *Mol Metab*, 2015. **4**(6): p. 437-60.
52. Cummings, D.E., *Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight*. *Physiol Behav*, 2006. **89**(1): p. 71-84.
53. Tschop, M., et al., *Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity*. *Diabetes*, 2001. **50**(4): p. 707-9.
54. Iglesias, M.J., et al., *Growth hormone releasing peptide (ghrelin) is synthesized and secreted by cardiomyocytes*. *Cardiovasc Res*, 2004. **62**(3): p. 481-8.
55. Kleinz, M.J., et al., *Functional and immunocytochemical evidence for a role of ghrelin and des-octanoyl ghrelin in the regulation of vascular tone in man*. *Cardiovasc Res*, 2006. **69**(1): p. 227-35.
56. Nagaya, N., et al., *Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2001. **280**(5): p. R1483-7.
57. Shimizu, Y., et al., *Ghrelin improves endothelial dysfunction through growth hormone-independent mechanisms in rats*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **310**(3): p. 830-5.
58. Poykko, S., et al., *Ghrelin Arg51Gln mutation is a risk factor for Type 2 diabetes and hypertension in a random sample of middle-aged subjects*. *Diabetologia*, 2003. **46**(4): p. 455-8.
59. Jiang, S.Z., et al., *Obesity and hypertension*. *Exp Ther Med*, 2016. **12**(4): p. 2395-2399.
60. Kotsis, V., et al., *Mechanisms of obesity-induced hypertension*. *Hypertens Res*, 2010. **33**(5): p. 386-93.
61. Wofford, M.R., et al., *Antihypertensive effect of alpha- and beta-adrenergic blockade in obese and lean hypertensive subjects*. *Am J Hypertens*, 2001. **14**(7 Pt 1): p. 694-8.
62. Mark, A.L., et al., *Contrasting blood pressure effects of obesity in leptin-deficient ob/ob mice and agouti yellow obese mice*. *J Hypertens*, 1999. **17**(12 Pt 2): p. 1949-53.

63. Sechi, L.A., *Mechanisms of insulin resistance in rat models of hypertension and their relationships with salt sensitivity*. J Hypertens, 1999. **17**(9): p. 1229-37.
64. Gudbjornsdottir, S., et al., *Insulin increases forearm vascular resistance in obese, insulin-resistant hypertensives*. J Hypertens, 1996. **14**(1): p. 91-7.
65. Landsberg, L., *Diet, obesity and hypertension: an hypothesis involving insulin, the sympathetic nervous system, and adaptive thermogenesis*. Q J Med, 1986. **61**(236): p. 1081-90.
66. Peti-Peterdi, J. and R.C. Harris, *Macula densa sensing and signaling mechanisms of renin release*. J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(7): p. 1093-6.
67. Lyons, H.J. and P.C. Chruchhill, *Renin secretion from rat renal cortical cell suspensions*. Am J Physiol, 1975. **228**(6): p. 1835-9.
68. Persson, P.B., *Renin: origin, secretion and synthesis*. J Physiol, 2003. **552**(Pt 3): p. 667-71.
69. Unger, T., *The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease*. Am J Cardiol, 2002. **89**(2A): p. 3A-9A; discussion 10A.
70. Yang, X.P., et al., *Effects of intravenous endothelin on hemodynamics and cardiac contractility in conscious Milan normotensive rats*. J Cardiovasc Pharmacol, 1991. **17**(4): p. 662-9.
71. Sparks, M.A., et al., *Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology*. Compr Physiol, 2014. **4**(3): p. 1201-28.
72. Allen, A.M., J. Zhuo, and F.A. Mendelsohn, *Localization and function of angiotensin AT1 receptors*. Am J Hypertens, 2000. **13**(1 Pt 2): p. 31S-38S.
73. Brenner, B.M., et al., *Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy*. N Engl J Med, 2001. **345**(12): p. 861-9.
74. Mehta, P.K. and K.K. Griendling, *Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(1): p. C82-97.

75. Geisterfer, A.A., M.J. Peach, and G.K. Owens, *Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells*. *Circ Res*, 1988. **62**(4): p. 749-56.
76. Touyz, R.M. and C. Berry, *Recent advances in angiotensin II signaling*. *Braz J Med Biol Res*, 2002. **35**(9): p. 1001-15.
77. Vickers, C., et al., *Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(17): p. 14838-43.
78. Donoghue, M., et al., *A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9*. *Circ Res*, 2000. **87**(5): p. E1-9.
79. Kucharewicz, I., et al., *Angiotensin-(1-7): an active member of the renin-angiotensin system*. *J Physiol Pharmacol*, 2002. **53**(4 Pt 1): p. 533-40.
80. Zhang, F., et al., *Angiotensin-(1-7) induced vascular relaxation in spontaneously hypertensive rats*. *Nitric Oxide*, 2019. **88**: p. 1-9.
81. Campagnole-Santos, M.J., et al., *Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides*. *Am J Physiol*, 1992. **263**(1 Pt 2): p. R89-94.
82. Pei, Z., et al., *Angiotensin-(1-7) ameliorates myocardial remodeling and interstitial fibrosis in spontaneous hypertension: role of MMPs/TIMPs*. *Toxicol Lett*, 2010. **199**(2): p. 173-81.
83. Marchini, G.S.e.a., *Experimental Method for Recording Epicardium Potentials and Cardiac Myocyte Shortening*. *Computing in Cardiology*, 2017. **44**.
84. Yildiz, O., Seyrek, M. & Gul, H.,, *Pharmacology of Arterial Grafts for Coronary Artery Bypass Surgery*. *Artery Bypass.*, 2013.
85. Wise, I.A. and F.J. Charchar, *Epigenetic Modifications in Essential Hypertension*. *Int J Mol Sci*, 2016. **17**(4): p. 451.
86. Younes-Rapozo, V., et al., *Early weaning is associated with higher neuropeptide Y (NPY) and lower cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) expressions in the paraventricular nucleus (PVN) in adulthood*. *Br J Nutr*, 2012. **108**(12): p. 2286-95.

87. Bonomo, I.T., et al., *Prolactin inhibition at the end of lactation programs for a central hypothyroidism in adult rat*. J Endocrinol, 2008. **198**(2): p. 331-7.
88. Legradi, G., et al., *Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus*. Endocrinology, 1997. **138**(6): p. 2569-76.
89. Garcia-Caceres, C., C.X. Yi, and M.H. Tschop, *Hypothalamic astrocytes in obesity*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2013. **42**(1): p. 57-66.
90. Bloomgarden, Z.T., *Third Annual World Congress on the Insulin Resistance Syndrome: associated conditions*. Diabetes Care, 2006. **29**(9): p. 2165-74.
91. Landsberg, L. and D.R. Krieger, *Obesity, metabolism, and the sympathetic nervous system*. Am J Hypertens, 1989. **2**(3 Pt 2): p. 125S-132S.
92. Rocchini, A.P., J.Q. Yang, and A. Gokee, *Hypertension and insulin resistance are not directly related in obese dogs*. Hypertension, 2004. **43**(5): p. 1011-6.
93. Hall, J.E., et al., *Obesity-induced hypertension: role of sympathetic nervous system, leptin, and melanocortins*. J Biol Chem, 2010. **285**(23): p. 17271-6.
94. Hall, J.E., *Louis K. Dahl Memorial Lecture. Renal and cardiovascular mechanisms of hypertension in obesity*. Hypertension, 1994. **23**(3): p. 381-94.
95. Bouret, S.G., *Crossing the border: developmental regulation of leptin transport to the brain*. Endocrinology, 2008. **149**(3): p. 875-6.
96. Rahmouni, K., et al., *Obesity-associated hypertension: new insights into mechanisms*. Hypertension, 2005. **45**(1): p. 9-14.
97. Hall, J.E., et al., *Role of sympathetic nervous system and neuropeptides in obesity hypertension*. Braz J Med Biol Res, 2000. **33**(6): p. 605-18.
98. Engeli, S. and A.M. Sharma, *Emerging concepts in the pathophysiology and treatment of obesity-associated hypertension*. Curr Opin Cardiol, 2002. **17**(4): p. 355-9.

99. Kuo, J.J., O.B. Jones, and J.E. Hall, *Inhibition of NO synthesis enhances chronic cardiovascular and renal actions of leptin*. Hypertension, 2001. **37**(2 Pt 2): p. 670-6.
100. DeFronzo, R.A., *The effect of insulin on renal sodium metabolism. A review with clinical implications*. Diabetologia, 1981. **21**(3): p. 165-71.
101. Rowe, J.W., et al., *Effect of insulin and glucose infusions on sympathetic nervous system activity in normal man*. Diabetes, 1981. **30**(3): p. 219-25.
102. Hall, J.E., *Mechanisms of abnormal renal sodium handling in obesity hypertension*. Am J Hypertens, 1997. **10**(5 Pt 2): p. 49S-55S.
103. Yiannikouris, F., et al., *Adipocyte-specific deficiency of angiotensinogen decreases plasma angiotensinogen concentration and systolic blood pressure in mice*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2012. **302**(2): p. R244-51.
104. Gomes, F.T., D. F.; Souza, H. P.; Nicolau, J. C.; Halpern, A.; Serrano, C. V., *Obesidade e doença arterial coronariana: papel da inflamação vascular*. Arq. Bras. Cardiol., 2010. **(94)**.
105. Wasserman, D.H., T.J. Wang, and N.J. Brown, *The Vasculature in Prediabetes*. Circ Res, 2018. **122**(8): p. 1135-1150.
106. Sorop, O., et al., *The microcirculation: a key player in obesity-associated cardiovascular disease*. Cardiovasc Res, 2017. **113**(9): p. 1035-1045.
107. Panza, J.A., et al., *Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension*. Circulation, 1993. **87**(5): p. 1468-74.
108. Tschudi, M.R., et al., *Antihypertensive therapy augments endothelium-dependent relaxations in coronary arteries of spontaneously hypertensive rats*. Circulation, 1994. **89**(5): p. 2212-8.
109. Esper, R.J., et al., *Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal*. Cardiovasc Diabetol, 2006. **5**: p. 4.
110. Bahia, L., et al., *[The endothelium in the metabolic syndrome]*. Arq Bras Endocrinol Metabol, 2006. **50**(2): p. 291-303.
111. Evora, L.E.C.M.F.V.R.C.P.R.B., *The experimental basis of hepatic ischemia-reperfusion injury: review*. Acta Cir. Bras. , 2004. **(19)**
112. Paulo Roberto B. Evora, P.J.P., John F. Seccombe, Hartzell V. Schaff, *Lesão de Isquemia-Reperusão. Aspectos Fisiopatológicos e a*

Importância da Função Endotelial. Arq Bras Cardiol, 1996. **(66)**.

113. Bernardo, B.C., et al., *Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies*. Pharmacol Ther, 2010. **128**(1): p. 191-227.
114. Levy, D., et al., *Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study*. N Engl J Med, 1990. **322**(22): p. 1561-6.
115. Yim, H.E., et al., *Overweight, hypertension and renal dysfunction in adulthood of neonatally overfed rats*. J Nutr Biochem, 2013. **24**(7): p. 1324-33.
116. Yamazaki, T., et al., *The renin-angiotensin system and cardiac hypertrophy*. Heart, 1996. **76**(3 Suppl 3): p. 33-5.
117. Simoes e Silva, A.C., et al., *ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis*. Br J Pharmacol, 2013. **169**(3): p. 477-92.
118. Fyhrquist, F. and O. Saijonmaa, *Renin-angiotensin system revisited*. J Intern Med, 2008. **264**(3): p. 224-36.
119. Halliwell, B., *Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life*. Plant Physiol, 2006. **141**(2): p. 312-22.
120. Masi, S., M. Uliana, and A. Viridis, *Angiotensin II and vascular damage in hypertension: Role of oxidative stress and sympathetic activation*. Vascul Pharmacol, 2019. **115**: p. 13-17.
121. Sun, Y., *Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors*. Cardiovasc Res, 2009. **81**(3): p. 482-90.
122. Paravicini, T.M. and R.M. Touyz, *NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities*. Diabetes Care, 2008. **31 Suppl 2**: p. S170-80.
123. Nordberg, J. and E.S. Arner, *Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system*. Free Radic Biol Med, 2001. **31**(11): p. 1287-312.
124. Kinnula, V.L. and J.D. Crapo, *Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors*. Free Radic Biol Med, 2004. **36**(6): p. 718-44.

125. Orcy, R.B., et al., *Signalization of Akt/PKB in the placenta, skeletal muscle and adipose tissue of preeclampsia patients*. Gynecol Obstet Invest, 2008. **66**(4): p. 231-6.
126. Zhang, G., et al., *Ghrelin and cardiovascular diseases*. Curr Cardiol Rev, 2010. **6**(1): p. 62-70.
127. Chang, L., et al., *Protective effects of ghrelin on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart*. J Cardiovasc Pharmacol, 2004. **43**(2): p. 165-70.



Goiânia, 08 de março de 2021.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO ATENDIMENTO DE PENDÊNCIA DO PROTOCOLO N°. 001/21

I - Finalidade do projeto de pesquisa: Pesquisa – Doutorado

II - Identificação:

- Data de apresentação a CEUA:** 28/01/2021
- Data do atendimento da pendência:** 08/03/2021
- Título do projeto:** Alterações cardiometabólicas em ratos submetidos ao desmame precoce farmacológico induzido por bromocriptina
- Pesquisador Responsável/ Unidade:** Rodrigo Mello Gomes ICB/UFG
- Pesquisadores Participantes:** Gabriel Camargo da Silva, doutorando IVB/UFG
- Médico Veterinário/CRMV:** Taís Andrade Dias de Souza/ GO4830
- Unidade onde será realizado:** DCiF/ICB/UFG

III – Respostas as pendências:

1- Solicitação da CEUA: Definir qual analgésico, tramadol ou flunixin, será utilizado após as cirurgias.

Resposta do Pesquisador Responsável: O analgésico a ser utilizado, após os procedimentos cirúrgicos, será o Tramadol (20 mg/kg – via i.p.)

2- Solicitação da CEUA: incluir um analgésico a ser inoculado antes ou durante a anestesia com tiopental sódico.

Resposta do Pesquisador Responsável: o Tiopental será administrado juntamente com o anestésico local, Lidocaína (i.p., 1 mg/kg de massa corporal).

3- Solicitação da CEUA: quais serão os finais humanitários com os filhotes fêmeas que porventura sejam utilizados para completar as linhagens.

Resposta do Pesquisador Responsável: No último dia do período de lactação (dia 21), quando utilizadas, as fêmeas serão submetidas à eutanásia por decapitação. Os corpos dos animais serão descartados em sacos especiais e mantidos congelados até serem coletados pelo serviço de coleta de resíduos biológicos da UFG, a empresa Stericycle.

4- Solicitação da CEUA: Prever e descrever quais os pontos finais humanitários dos ratos machos que posteriormente ao acasalamento serão utilizados para treino.

Resposta do Pesquisador Responsável: Os ratos machos, ao final do período de acasalamento, serão avaliados quanto ao seu estado de saúde. Além disso, o peso corporal, ingestão de ração e água serão monitorados. Após os animais apresentarem um bom estado de saúde, iniciaremos o

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



treinamento de canulação. Ao final do treinamento, os mesmos serão submetidos à eutanásia por decapitação. Posteriormente, os corpos dos animais serão descartados em sacos especiais e mantidos congelados até serem coletados pelo serviço de coleta de resíduos biológicos da UFG, a empresa Stericycle. Os animais que não apresentarem um bom estado de saúde ao final do período de acasalamento, serão submetidos à eutanásia como descrito anteriormente.

Houve adequação do cronograma por parte do pesquisador responsável.

VI - Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, o projeto foi considerado **APROVADO** pela *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Federal de Goiás.

Informação aos pesquisadores:

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(s) pesquisador(es) responsável(is) deverá(ão) encaminhar à CEUA-PRPI-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, a qual está prevista para finalizar suas ações até **30 de novembro de 2023**.

VII - Data da reunião: 08/03/2023.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufg@gmail.com



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada “**Alterações cardiometabólicas em ratos submetidos ao desmame precoce farmacológico induzido por bromocriptina**”, registrada com o protocolo nº **001/21**, sob a responsabilidade de **Rodrigo Mello Gomes** e **Gabriel Camargo da Silva** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (UFG), em reunião de **08/03/2021**.

- Finalidade: () Ensino (x) Pesquisa Científica
- Vigência da autorização (início e fim): 08/03/23 a 30/11/2023
- Espécie/linhagem/raça: *Ratus norvegicus*/wistar
- Nº de animais autorizados: 57 machos e 9 fêmeas.
- Peso/Idade: machos e fêmeas/ 21 a 180 dias ou 70 a 450 g.
- Sexo: machos e fêmeas
- Origem (fornecedor): Biotério Central

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufg@gmail.com